

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

**OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO  
BIOSURFACTANTE DE BAIXO CUSTO LUNASAN PRODUZIDO POR *CANDIDA*  
*SPHAERICA* UCP 0995**

**JULIANA MOURA DE LUNA**

**RECIFE**

**2010**

**OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO  
BIOSURFACTANTE DE BAIXO CUSTO LUNASAN PRODUZIDO POR *CANDIDA  
SPHAERICA* UCP 0995**

**JULIANA MOURA DE LUNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área: Biotecnologia

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. LEONIE ASFORA SARUBBO

RECIFE

2010

**Luna, Juliana Moura de**

**Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biossurfactante de baixo custo Lunasan produzido por *Candida Sphaerica* UCP 0995 / Juliana Moura de Luna. – Recife: O Autor, 2010.**

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

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

**Inclui bibliografia.**

1. Surfactantes 2. Agentes ativos de superfícies 3. Resíduos industriais 4. Biotecnologia – Indústria I. Título.

**668.1**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/ CCB – 2010- 085**

OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS DO BISSURFACTANTE DE BAIXO CUSTO  
LUNASAN PRODUZIDO POR CANDIDA SPHAERICA UCP 0995

COMISSÃO EXAMINADORA



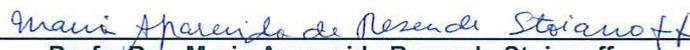
---

Profa. Dra. Galba Maria de Campos –Takaki (Orientadora)  
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE



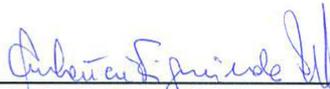
---

Profa. Dra. Celuta Sales Alvino  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ



---

Profa. Dra. Maria Aparecida Resende Stoianoff  
Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais-MG



---

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE



---

Profa. Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti  
Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

## **Dedico**

### **Meus Pais**

Mauricio de Souza Luna

Maria Vaneide Moura de Luna (*in memoriam*)

### **Minha Irmã**

Mariana Moura de Luna

### **Meu Amor**

Marcelo Mulatinho

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos em todos os momentos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação, atenção e principalmente, por todos os conhecimentos científicos transmitidos no decorrer desses anos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leonie Asfora Sarubbo, pela aprendizagem, amizade, atenção e incentivo durante todos esses anos de convívio.

Ao Prof.Dr Elias Basile Tambourgi, pela amizade, incentivo e confiança.

Ao Prof.Dr. José Couto Teixeira e a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Lúgia Raquel Rodrigues, pela atenção, e oportunidade em fazer doutorado sanduíche na Universidade do Minho, Braga - Portugal.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Clarissa Daisy Costa Albuquerque, pela atenção e contribuição estatística.

À meu pai, Maurício Luna, pelo exemplo de vida, dedicação e incentivo.

À minha querida irmã Mariana, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À Marcelo Mulatinho, pelo amor, incentivo e por compartilhar comigo todas as alegrias e dificuldades durante todo esse tempo em que estamos juntos.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) pelos momentos de confraternizações, em especial aos amigos do grupo de pesquisa em biossurfactantes, Raquel Diniz Rufino, Charles Bronzo Barboza Farias, Aline Ferreira da Silva, Danielle Khadydja Félix dos Santos, Camila de Figueredo Albuquerque, Selma Neide Rodrigues Lopes da Silva, Humberto Bezerra de Souza Sobrinho, Ranielly Monteiro Batista, Camila Coimbra e Carolina Buarque de Gusmão pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

À Thayse Alves, minha amiga desde a graduação, pelo incentivo, apoio e confiança.

À Viviane Asfora, pela atenção, disponibilidade e ajuda nas análises do solo.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia de Figueredo Porto, pela amizade e oportunidade do Estágio Docência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

À coordenadora do Doutorado prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Tereza Correia, pela atenção que sempre me dispensou.

Aos funcionários do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana (*in memoriam*) André Felipe Santos Lima e Sônia Maria de Souza, pela atenção e apoio durante o decorrer do trabalho.

À Secretária do CCB, Adenilda Eugênia de Lima, por toda atenção e carinho.

Á toda minha turma de doutorado, companheiros e amigos.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Pe. Pedro Rubens de Oliveira, pelo acesso aos laboratórios de NPCIAMB para realização deste trabalho.

Á FACEPE/ CAPES pela concessão da bolsa de estudo e CNPq, FINEP pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche na Universidade do Minho, Portugal.

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

## SUMÁRIO

	<b>página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	iv
<b>RESUMO.....</b>	vi
<b>ABSTRACT.....</b>	vii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	4
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	6
<b>3.1 Biossurfactantes.....</b>	7
<b>3.1.1 Classificação e natureza química.....</b>	8
<b>3.1.2 Propriedades.....</b>	10
<b>3.1.3 Microrganismos produtores.....</b>	12
<b>3.1.4 Vantagens no uso de biossurfactantes.....</b>	15
<b>3.1.5 Aplicações industriais.....</b>	17
<b>3.1.5.1 Aplicação na indústria de petróleo.....</b>	17
<b>3.1.5.2 Limpeza de reservatórios de óleos.....</b>	18
<b>3.1.5.3 Aplicação na mineração.....</b>	18
<b>3.1.5.3.1 Metais pesados.....</b>	18
<b>3.1.5.3.2 Remoção de metais pesados por biossurfactantes.....</b>	20
<b>3.1.5.4 Aplicação na indústria de alimentos.....</b>	23
<b>3.1.5.5 Aplicação na indústria de higiene e cosméticos.....</b>	24
<b>3.1.5.6 Aplicação na indústria na medicina.....</b>	24
<b>3.1.5.7 Aplicação na agricultura.....</b>	26
<b>3.1.6 Produção de biossurfactante utilizando resíduos</b>	

<b>industriais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.7 Perspectivas de utilização.....</b>	<b>31</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Artigo 1.....</b>	<b>50</b>
<b>6. Artigo 2.....</b>	<b>79</b>
<b>7. Artigo 3.....</b>	<b>111</b>
<b>8. Artigo 4.....</b>	<b>130</b>
<b>9. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>150</b>

## LISTA DE FIGURAS

página

<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
Figura 1 - Representação de moléculas anfifílicas solúveis em água com formação de micelas.....	7
Figura 2 - Estruturas químicas de biossurfactantes (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).....	10
Figura 3 - Surfactantes são caracterizados por uma estrutura anfipática. As propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas dependem da carga do grupo polar (aniônico, catiônico, neutro ou anfotérico). (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica ligada à cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar; e (e) representação de uma vesícula (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).....	11
Figura 4 - Distribuição do biossurfactante numa solução aquosa, efeito na Tensão superficial e CMC.....	12
Figura 5 - Mecanismo para a remoção de metal por um biossurfactante.....	23
<b>Artigo 1.....</b>	<b>50</b>
Figura 1- Primeiro planejamento fatorial completo $2^2$ - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.....	74
Figura 2- Segundo planejamento fatorial completo $2^2$ – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.....	75

Figura 3 - Terceiro planejamento fatorial completo $2^2$ – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.....	76
Figura 4 - Planejamento composto central - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.....	77
Figura 5- Superfície de resposta da tensão de superficial mostrando a interação entre as concentrações resíduo de óleo de soja e milhocina.....	78
<b>Artigo 2</b> .....	79
Figura 1- Curvas de crescimento, pH, tensão superficial e rendimento em biossurfactante isolado de <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 9,0 % de resíduo de refinaria e 9,0 % de milhocina.....	107
Figura 2- Influencia da temperatura (A), da variação do pH (B) e da adição de NaCl na redução da tensão superficial do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> cultivada em 9,0 % de resíduo de refinaria e 9,0% de milhocina .....	108
Figura 3- Influencia da temperatura (A), adição de NaCl (B) e do pH(C) na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> cultivada em 9,0 % de resíduo de refinaria e 9,0% de milhocina .....	109

Figura 4- Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> cultivada em água destilada suplementada com 9,0 % de resíduo e 9,0 % de milhocina.....	110
<b>Artigo 3</b> .....	111
<b>Artigo 4</b> .....	130

## LISTA DE TABELAS

Página

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores (DESAI & BANAT, 1997).....	9
Tabela 2 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes (BANAT, 2000).....	27
Tabela 3 - Matérias-primas de baixo custo e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes.....	30

### Artigo 1.

Tabela 1 - Níveis e valores das variáveis independentes dos planejamentos fatoriais completos $2^2$ .....	70
Tabela 2 - Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento composto central $2^2$ .....	71
Tabela 3 - Valores codificados e resultados de tensão superficial dos planejamentos fatoriais completos $2^2$ .....	72
Tabela 4 - Valores codificados e resultados de tensão superficial do planejamento composto central $2^2$ .....	73

### Artigo 3

Tabela 1 - Porcentagem de inibição de crescimento obtida para diferentes microrganismos utilizando biossurfactante produzido por <i>C. sphaerica</i> UCP 0995.....	128
Tabela 2 - Taxas de inibição microbiana obtidas no ensaio de atividade anti-adesiva do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> UCP 0095, em microplaca.....	129

## **Artigo 4**

Tabela 1 – Determinações químicas e físicas do solo contaminado do município de Belo Jardim..... 148

Tabela 2 – Remoção dos metais pesados ferro, zinco e chumbo contidos no solo do Município de Belo Jardim pelos tratamentos..... 149

## RESUMO

Muitos biossurfactantes têm sido produzidos, embora poucos sejam comercializados em virtude do alto custo de produção. Considerando o potencial de aplicação desses compostos na indústria de petróleo e farmacêutica, estudou-se a otimização do uso de dois resíduos industriais, milhocina e resíduo de refinaria de óleo vegetal como nutrientes de baixo custo para a produção de um biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995. Após estabelecimento do meio de produção, o biossurfactante foi isolado e caracterizado quanto às suas propriedades físico-químicas, sendo testado quanto ao seu potencial de aplicação biotecnológica na área ambiental e na medicina. A otimização do meio de produção foi realizada através de planejamentos fatoriais  $2^2$  e metodologia de superfície de resposta, selecionando-se a condição de cultivo contendo 9% de resíduo da indústria de óleo de soja e 9% de milhocina. O líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante denominado de Lunasan produzido na condição selecionada, após 144 horas de cultivo a 150 rpm, revelou a capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de 57 mN/m para valores em torno de 25mN/m, com uma tensão interfacial contra n-hexadecano de 12,5 mN/m. O biossurfactante produzido demonstrou estabilidade em condições extremas de pH (2-12), temperatura (5, 70, 100 e 120°C) e concentrações salinas (2-10%). O rendimento do biossurfactante isolado foi de 9,0 g/L, com uma concentração micelar crítica de 0,025%. O biossurfactante foi caracterizado como um glicolípido aniônico composto por 70% de lipídios e 15% de carboidratos. O biossurfactante demonstrou atividades antimicrobiana e anti-adesiva para bactérias (*Lactobacillus casei* 36, *L.casei* 72, *L.reuteri* 104R, *L. reuteri* ML1, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *S. mutans* HG, *S. mutans* NS, *S. sanguis* 12, *S. pyogenes*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *R. dentocariosa*) e leveduras (*C. albicans* e *C. tropicalis*). O biossurfactante foi testado na remoção de metais pesados contidos em solo de uma indústria de bateria automotivas. Remoções de 86, 75 e 50% foram obtidas para Fe, Zn e Pb, respectivamente, quando se utilizou a solução do surfactante a 2,5%, embora o líquido metabólico também tenha removido percentuais comparáveis aos obtidos com o surfactante isolado. Os resultados obtidos demonstraram o potencial biotecnológico do biossurfactante de baixo custo produzido pela *Candida sphaerica* sugerindo aplicações em diferentes setores industriais e ambientais.

**Palavras-chave:** Biossurfactante, *Candida sphaerica*, Resíduos industriais

## ABSTRACT

Many biosurfactants have been produced, although few are produced due to the high costs of production and purification processes. Given the potential for biotechnological application of these compounds in the oil and pharmaceutical industries, the optimization of the use of two industrial wastes, corn steep liquor and soy bean oil refinery residue as low cost nutrients for the production of a biosurfactant by *Candida sphaerica* (UCP 0995) was studied. Then the properties of the biosurfactant was described, and its isolation, preliminary chemical characterization and biotechnological applications such as heavy metals removal and antimicrobial and anti-adhesive activities were evaluated. First, the optimization of the production was studied according to factorial designs and response surface methodology, which permitted the selection of the cultivation condition with 9% refinery residue and 9% of corn steep liquor. The cell-free broth containing the biosurfactant produced after 144 hours at 150 rpm showed ability to reduce the surface tension from 57 mN/m to values around 25mN/m, with an interfacial tension against n-hexadecane of 12.5 mN/m. The biosurfactant demonstrated stability under extreme conditions of pH, temperature and salt concentrations. The yield of biosurfactant was 9.0 g/L, with a critical micelle concentration of 0.025%. The biosurfactant was characterized as an anionic glycolipid composed of 70% lipids and 15% carbohydrates. The biosurfactant showed antimicrobial and anti-adhesive activities against bacteria (*Lactobacillus casei* 36, *L.casei* 72, *L.reuteri* 104R, *L. reuteri* ML1, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *S. mutans* HG, *S. mutans* NS, *S. sanguis* 12, *S. pyogenes*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *R. dentocariosa*) and yeasts (*Candida albicans* e *C. tropicalis*). The biosurfactant was applied to the removal of heavy metals adsorbed in a soil from an automotive battery industry. Removals of 86, 75 and 50% were obtained for the heavy metals Fe, Zn and Pb, respectively, when using the solution of surfactant at 2.5%, although the cell-free broth had removed percentages comparable to the solutions of the isolated surfactant. The results demonstrated the biotechnologic potential of this low cost biosurfactant produced by *Candida sphaerica* suggesting its application in different industrial sectors and in the environment.

**Key-words:** biosurfactant, *Candida sphaerica*, industrial residues

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

Com a globalização da indústria e a necessidade de sustentabilidade ambiental, que busca tratar praticamente todos os resíduos gerados, a biotecnologia oferece soluções para reduzir os problemas ambientais gerados pelos grandes complexos industriais, destacando-se a indústria petroquímica. Os processos de biorremediação e biorremoção surgem como tecnologias inovadoras e apresentam resultados satisfatórios na remoção dos poluentes derivados de petróleo e metais pesados (LUNA et al., 2009)

Portanto, os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. Suas estruturas moleculares, com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, permitem a ação desses compostos na formação de micelas, de macro ou micro emulsões, no aumento da solubilidade e da detergência (LANG; WULLBRANDT, 1999).

A busca por surfactantes naturais em substituição aos sintéticos derivados do petróleo tem sido assunto de grande interesse da biotecnologia, em função da necessidade de preservação ambiental. Neste contexto, destacam-se os surfactantes produzidos por microrganismos, denominados de biossurfactantes (HABA et al., 2000).

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos) apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, tais como glicolipídios, lipopeptídeos, complexos proteínas - polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, apresentando diversas propriedades e funções fisiológicas entre as várias famílias destes biopolímeros (COOPER; ZAJIC, 1980; SAINT- BLANQUAT, 1984; ABU-RUWAIDA et al., 1991; BLOOMBERG, 1991, CARRILO et al., 1996)

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicações em vários processos industriais, além da possibilidade de novas aplicações para estas biomoléculas. Acredita-se que os biossurfactantes ficarão conhecidos como as “moléculas multifuncionais” do novo século (MUTHUSAMY et al., 2008).

Os biossurfactantes podem ser aplicados em diversos setores industriais, tais como: farmacêutico, cosmético e alimentício, entre outros. As inúmeras aplicações envolvem desde ação de detergência à solubilização e dispersão de fases (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2003; HUA et al., 2003).

O maior mercado para os biossurfactantes vem sendo a indústria petrolífera, onde podem ser utilizados na biorremediação e dispersão de derramamentos de óleos,

remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques de estocagem, na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, bem como na remoção de metais pesados presentes em solos (MULLIGAN et al., 2001; MULLIGAN, 2005).

Neste sentido, os estudos para a produção de agentes surfactantes representam uma alternativa não só para o controle e prevenção da poluição ambiental, mas, sobretudo, para atender as demandas dos diversos setores industriais.

Entre os trabalhos com leveduras do gênero *Candida* destacam-se as tecnologias amplamente investigadas sobre a produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* utilizando fontes nutricionais de baixo custo, como óleos vegetais e resíduos industriais (VANCE-HARROP et al., 1997; SARUBBO et al., 1997; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP, 2000; SARUBBO et al., 2001; RUFINO et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2008; ANDRADE et al., 2009).

Na presente tese foi investigada a produção de agente surfactante a partir de uma nova espécie de *Candida sphaerica* UPC 0995 utilizando como meio base o resíduo da refinaria de óleo de soja e milhocina, como substratos de baixo custo. No processo de otimização foram utilizados planejamentos fatoriais, sendo o biossurfactante posteriormente isolado e caracterizado quanto às propriedades tensoativas e emulsificantes. Por fim, o potencial biotecnológico do biossurfactante Lunasan foi avaliado com aplicações na área médica, como agente anti-adesivo e antimicrobiano bem como na área ambiental, através da remoção de metais pesados pelo fenômeno de adsorção do solo.

## OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Realizar a otimização da produção biossurfactante utilizando meio de cultura de baixo custo por *Candida sphaerica* UCP 0995, como também avaliar o seu potencial para aplicações biotecnológicas.

### 2.2 Específicos

- Otimizar a produção do biossurfactante através de planejamentos fatoriais sequenciais;
- Descrever as cinéticas de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante no meio otimizado;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante sob condições específicas de pH, temperatura e nas diferentes concentrações de sal;
- Isolar o biossurfactante produzido e determinar o rendimento em produção;
- Avaliar a eficiência do biossurfactante através da determinação da concentração micelar crítica;
- Determinar a tensão superficial e interfacial do biossurfactante;
- Determinar a composição bioquímica do biossurfactante;
- Determinar a carga iônica do biossurfactante;
- Testar a atividade anti-adesiva do biossurfactante;
- Testar a atividade antimicrobiana do biossurfactante;
- Investigar o potencial do biossurfactante na remoção dos metais pesados zinco, ferro e chumbo adsorvidos em solo.

## REVISÃO DA LITERATURA

---

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção polar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto que a apolar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (MARÍN, 1996; SOUZA SOBRINHO et al., 2008). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade óleo/água e água/óleo (DESAI, 1997; PEKDEMIR, 1999) (Figura1).

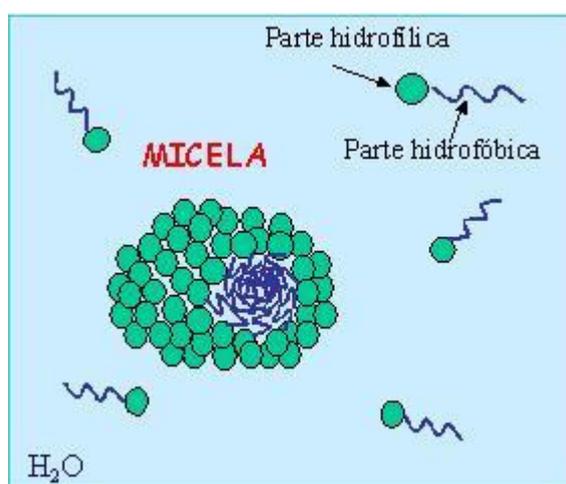


Figura 1- Representação de moléculas anfifílicas solúveis em água com formação de micelas (Fonte: <http://www.fsc.ufsc.br/bechtold/grupo/cristal.html>)

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras, os quais exibem propriedades surfactantes com alta capacidade emulsificante e redução da tensão superficial (HOLMBERG, 2002).

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 disponíveis é sintetizada a partir de derivados de petróleo; entretanto, as legislações de proteção ao meio ambiente, bem como, a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado à procura de surfactantes naturais em substituição aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos e podem também ser utilizados em uma grande variedade de aplicações industriais, porém ainda não são utilizados em larga escala devido aos custos de produção (VAN-HAMME et al., 2003), apesar de serem produzidos a partir de fontes renováveis e possuírem baixa toxicidade (QUEIROGA et al., 2003).

### **3.1.1 Classificação e natureza química**

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química ou origem microbiana (Tabela 1). As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (SOON et al., 2004; SINGH et al., 2007).

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

A habilidade dos surfactantes em atuar na interface entre dois líquidos imiscíveis deve-se a sua natureza anfipática. O grupo polar da molécula, constituído de mono, di ou polissacarídeos, ácidos carboxílicos, aminoácidos ou peptídeos, tem afinidade pela fase aquosa (hidrofílico) na qual se dissolve, enquanto que a porção apolar (hidrofóbica), usualmente uma cadeia de hidrocarboneto, tem afinidade pela fase orgânica (DELEU; PAQUOT, 2004). A Figura 2 ilustra algumas estruturas químicas de biossurfactantes.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

<b>Classe / Tipo de Biossurfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Glicolipídeos</b>	
ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, T. apicola</i>
treololipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
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>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
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>
<b>Surfactantes particulados</b>	
vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
células	Várias bactérias

Fonte: DESAI; BANAT, 1997

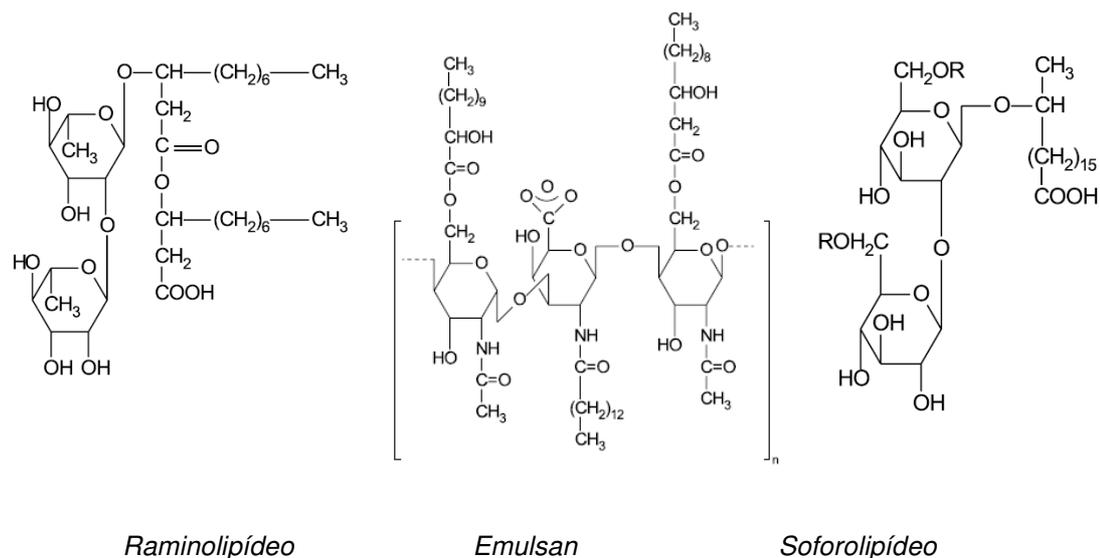


Figura 2 - Estruturas químicas de biossurfactantes (Fonte: DESAI; BANAT, 1997)

### 3.1.2 Propriedades

Os surfactantes atuam como um produto que facilita a formação de uma emulsão devido à capacidade de reduzir a tensão interfacial entre duas fases distintas e, numa etapa subsequente, estabiliza 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; STAMPFLI; NERSTEN, 1995).

A tensão superficial é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando concentração de surfactante no meio aumenta, ocorrendo a formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula, enquanto que, as porções hidrofóbicas para a parte interna. A concentração dessas micelas estabelece a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 4). Quando a CMC é atingida, a concentração máxima de micelas são formadas (PIRÔLLO, 2006; LUNA et al., 2008)

A CMC é dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante podendo ser definida também como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial (SOUZA SOBRINHO et al., 2008). A eficiência e a efetividade são características

básicas essenciais que determinam a qualidade do surfactante. A eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 2000 mg/L, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir valores em torno de 31 e 1 mN/m, respectivamente (BARROS et al., 2007). Na prática, a CMC representa também o máximo de monômeros de surfactantes presentes na água, os quais são influenciados pelo pH, temperatura e ligações iônicas (Figura 3).

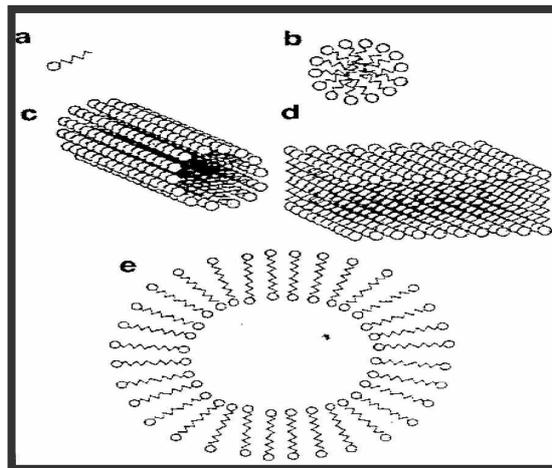


Figura 3 – Estruturas de surfactantes de acordo com as propriedades hidrofóbicas e hidrofílica. (a) monômero surfactante; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar; e (e) representação de uma vesícula (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002)

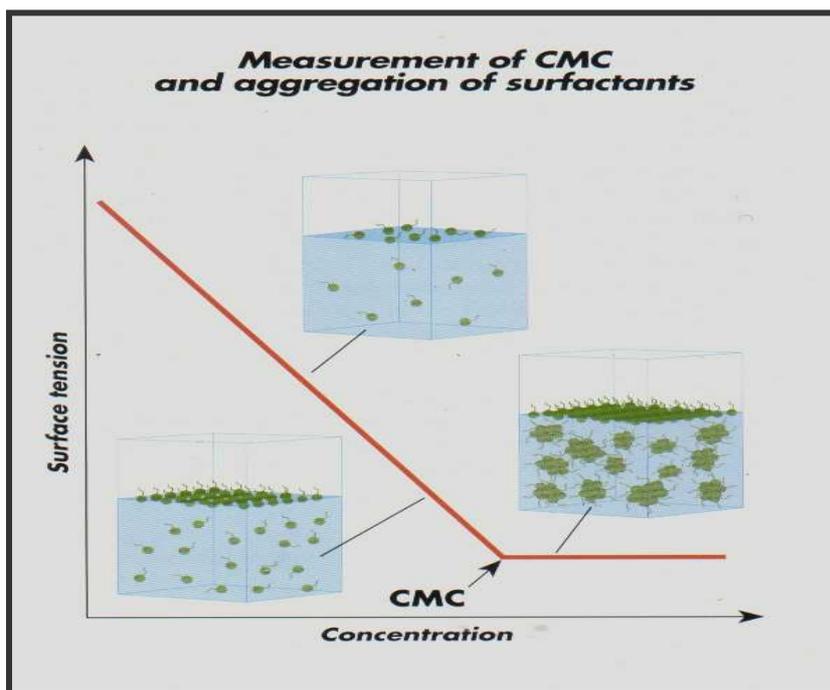


Figura 4 - Formação de micelas na CMC (Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>)

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como a redução da tensão superficial, a capacidade espumante, emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade, e detergência são muito importantes na avaliação de seu desempenho e no processo de seleção de microrganismos com potencial de produção (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

### 3.1.3 Microrganismos produtores

Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microrganismos e estes podem utilizar uma diversidade de substratos, desde os hidrocarbonetos até os substratos insolúveis (HITSATSUK et al., 1971; COOPER et al., 1984; JAVERI et al., 1985). Muitos deles produzem uma mistura complexa de polímeros, particularmente durante o crescimento em substratos imiscíveis. A maioria dos biossurfactantes encontrados tem sido principalmente produzida por bactérias, seguindo-se as leveduras e alguns fungos filamentosos (Tabela 1) (GERRA-SANTOS et al., 1984; SYLDAK et al., 1987).

Os tipos, a quantidade e a qualidade do biossurfactante produzido são influenciados pela natureza das fontes de carbono, do substrato e concentração de íons como P, N,

Mg e Fe presentes no meio de cultura, além das condições do cultivo (ROBERT et al., 1989).

Os hidrocarbonetos são os substratos mais utilizados na produção de biossurfactantes (YOUSSEF et al., 2004). A produção pode estar associada a um agente emulsificante (extracelular) ou a um componente que facilite a passagem do substrato na membrana celular (associação de membrana celular). Os biossurfactantes, no entanto, podem também ser produzidos por substratos solúveis, como os carboidratos (SARUBBO et al., 2001) ou a partir da combinação entre um substrato solúvel e insolúvel, como descrito para leveduras (AKSU, 2004).

Um grupo de biossurfactantes muito estudado é o de raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (GUERRA-SANTOS et al., 1984). Valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos desses componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos, incluindo alcanos (C11 e C12) piruvato, citrato, frutose, glicerol, óleo de oliva e glicose (ROBERT et al., 1989). A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, pH, composição dos nutrientes, substrato e temperatura utilizada (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

*Bacillus subtilis* são produtores de lipopeptídeos, como a chamada surfactina, a qual contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxila e hidroxila do ácido C14 (KAKINUMA et al., 1969). Concentrações de surfactina menores que 0,005 % reduzem a tensão superficial para 27 mN/m, tornando a surfactina um dos mais poderosos biossurfactantes. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, por outro lado, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (HUE et al., 2001).

Estudos realizados utilizando *Kocuria rhizophila* mostraram a utilização de sacarose, querosene e óleo de soja como substratos; entretanto, a bactéria não foi capaz de utilizar querosene como fonte de carbono. A produção do biossurfactante aconteceu independente do crescimento celular em meio contendo óleo de soja (URUM, 2004).

Entre as leveduras mais utilizadas, os isolados do gênero *Candida* têm sido empregados com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e conseqüentemente, na produção de biossurfactantes. Em 1979, Pareilleux observou a presença de um polímero extracelular por *C. lipolytica* com propriedades emulsificantes, quando esta foi crescida em n-tetradecano ou na mistura de hidrocarbonetos lineares. Os polímeros recuperados do líquido metabólico demonstraram serem moléculas complexas, constituídas por uma fração lipídica, uma protéica e outra por carboidratos, sendo esta

última, em maior quantidade. Os resultados sugeriram que, para qualquer n-alcano utilizado como fonte de carbono, todos os componentes do polímero e suas respectivas proporções na molécula permaneciam inalterados.

Por outro lado, Cirigliano e Carman (1985) isolaram um bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares; enquanto que, Marçal (1991) demonstrou a produção de biopolímeros por *C. lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais (óleo de babassu, coco e dendê). Sarubbo et al. (1999; 2001) também utilizaram a *C. lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo de babaçu e glicose como substratos.

*C. tropicalis* quando crescida em culturas em batelada alimentada utilizando n-hexadecano como fonte de carbono, exibiu produção de biossurfactante (SING et al., 1990). No mesmo ano, Kitamoto et al.,(1999) estudaram a produção de biossurfactantes por *C. antarctica* quando cultivada em óleo de soja como fonte de carbono, sendo o biopolímero constituído por glicolipídeos. Segundo Persson et al., (1999), a *C. bombicola* destaca-se entre as leveduras pelo alto rendimento na produção de biossurfactante (67 g/L), por fermentador, utilizando óleo de milho e glicose como substratos. Bednarski et al., (2004) estudaram a produção de biossurfactantes por *C. apicola* ATCC96134 utilizando um resíduo da refinaria de óleo como substrato.

Sarubbo et al. (2006) demonstraram a possibilidade de combinação entre duas fontes, uma solúvel e outra insolúvel, para a produção de um biossurfactante por *C. glabrata*. Rufino (2007) utilizou com sucesso um resíduo industrial na produção de um biossurfactante por *C. lipolytica*. Souza Sobrinho et al. (2008), estudaram a produção de biossurfactante por *C. sphaerica* UCP 0995 utilizando resíduo da indústria de óleo de soja e milhocina como substratos, obtendo uma CMC de 0,08%.

Em estudos com duas espécies de leveduras *Pichia membranaefaciens* e *Pichia anomala*, cultivadas em meio mineral contendo 2 % de glicerol, ocorreu a produção de biossurfactantes. O mesmo não ocorreu quando gasolina e querosene a 2 % foram adicionados como substratos (ARAGÃO et al., 2007)

Luna et al., 2008, estudaram a produção de biossurfactante por *Candida glabrata* utilizando o meio formulado com água do mar, obtendo excelentes resultados de tensão superficial 27 mN/M.

Coimbra et al., 2009, estudaram a produção de biossurfactante em meio mineral utilizando diferentes espécies de *Candida* (*C. tropicalis*, *C.sphaerica*, *C. glabrata*, *C.*

*buinensis*, *C. lipolytica* e *C. guillermondii*), obtiveram resultados satisfatórios de tensão superficial.

Luna et al., 2009, estudaram a produção de biossurfactante por *Candida glabrata* utilizando o meio mineral 7,5 % de óleo de algodão, 5,0 % de glicose e 0,3% de extrato de levedura obtendo uma tensão superficial de 31 mN/M.

### **3.1.4 Vantagens no uso de biossurfactantes**

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam uma vantagem sobre os surfactantes convencionais sintéticos (REISER, 1989; ARORA, et al., 1992; MULLIGAN et al., 1993). Destacam-se:

- diversidade: existe um grande espectro de surfactantes para satisfazer a demanda industrial. Quase toda aplicação comercial possui condições únicas que ditam o melhor tipo de surfactante a ser utilizado. Um dos maiores problemas existentes hoje para os surfactantes microbianos é selecionar na diversidade microbiológica microrganismos que produzam surfactantes com chances de serem comercializados com sucesso no mercado (BANAT, 1995a);
- biodegradabilidade e inativação controlada dos biossurfactantes: vários surfactantes quimicamente sintetizados e comercializados resistem a biodegradação, acumulam-se na natureza e causam problemas ecológicos. Surfactantes microbiológicos, como todos os produtos naturais, são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos (BANAT, 1995b);
- seletividade para interfaces específicas: um dos vários princípios das moléculas biológicas é sua notável especificidade comparada aos materiais quimicamente sintetizados (LIN, 1996);
- atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados) pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (DESAI, 1997);

- baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, além disso, sua baixa toxicidade permite seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (BONGNOLO, 1999);
- tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas e pH entre 5-12. Os biossurfactantes suportam concentrações a 10% de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (MEYLHEUC; HENRY, 2001).

Alguns pontos desfavoráveis devem ser citados (RAHMAN; GAKPE, 2008):

- A produção em grande escala de biossurfactantes pode ser dispendiosa. Esse problema, entretanto, pode ser resolvido pela combinação de substratos de baixo custo.
  - A obtenção de produtos com elevado grau de pureza se torna difícil em virtude da necessidade de etapas consecutivas de purificação do líquido metabólico.
  - A existência de espécies superprodutoras é rara e as conhecidas não são capazes de produzir altos rendimentos em surfactantes, além de necessitarem meios de cultivo complexos.
    - A regulação da síntese de biossurfactantes não está totalmente elucidada, uma vez que essas biomoléculas podem ser produzidas como metabólitos secundários ou em associação ao crescimento microbiano.
    - O aumento da produtividade é muitas vezes prejudicado pela formação de espuma, o que requer a utilização de meios diluídos.

### **3.1.5 Aplicações Industriais**

Estima-se que a produção mundial de surfactantes exceda três milhões de toneladas por ano (BROWN, 1991; ZHOU; KOSARIC, 1995; SHEPHERD et al., 1995) sendo utilizados principalmente como matéria-prima na fabricação de detergentes de uso doméstico (FIECHTER, 1992; GERSON, 1993; MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000). Na nova era da globalização muitas indústrias clássicas estão sendo inovadas e redirecionadas para novas tecnologias onde a biotecnologia tem um desafio que permite diversas oportunidades de pesquisas sem alterar a produtividade. O rápido desenvolvimento da biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado (VAN HAMME et al., 2006; CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009).

#### **3.1.5.1 Aplicação na indústria de petróleo**

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (BANAT, 1995a; LIN, 1996). Também são aplicados na biorremediação e dispersão de derramamentos de óleos e na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) (COBENAS et al., 1998; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Os biossurfactantes vêm sendo testados em recuperação de óleos e no transporte de óleo bruto, mostrando-se eficientes na redução da tensão interfacial óleo/água *in situ*, na redução da viscosidade do óleo, e na limpeza da areia (GARCIA-OCHOA; CASAS, 1999; FOX et. al., 2000). As moléculas de emulsan, um biossurfactante constituído por polissacarídeo, ácidos graxos e proteínas, vêm sendo comercializado para este propósito (BANAT et al., 2000; DUBEY; JUWAKAR, 2001). A maioria dos biossurfactantes são produzidos a partir de microrganismos aeróbios, embora existam alguns relatos sob anaeróbios, como o *Bacillus licheniformes*, que podem ser utilizados na biorremediação de locais onde ocorrem derramamento de óleos (RON & ROSENBERG, 2002).

O biossurfactante produzido pela bactéria Pet 1006 para a limpeza de tanques em substituição aos surfactantes convencionais. O produto bacteriano promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (ROBERT et al. 1991).

Os surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *Bacillus subtilis* demonstraram bons resultados na remoção de piche em solos

contaminados (BOGNOLO, 1999). Já Mulligan e colaboradores (2001) utilizaram surfactina, raminolipídios e soforolipídios na remoção de metais pesados de sedimentos. Kitamoto et al. (2002) viabilizaram o uso de biossurfactante como efetivo agente antiaglomeração.

### **3.1.5.2 Limpeza de reservatórios de óleos**

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos ou podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos impactantes (GOUVEIA et al., 2003; BENINCASA, 2007).

### **3.1.5.3 Aplicação na Mineração**

#### **3.1.5.3.1 Metais Pesados**

Os poluentes inorgânicos presentes nos solos com maior potencial de risco ao homem são os metais pesados. Segundo Soares (2004), o termo metal pesado é utilizado para identificar elementos com densidade maior que  $5 \text{ g cm}^{-3}$  ou com número atômico maior que 20; embora nem todos os elementos enquadrados sejam metais.

Os metais pesados ocorrem naturalmente no ambiente e estão presentes em rochas, solos, plantas e animais. Os metais ocorrem em diferentes formas: como íons dissolvidos em água, vapor, ou sais minerais em rochas, areia e solo. Eles podem também estar ligados a moléculas orgânicas e inorgânicas ou atrelados por partículas no ar. Ambos processos naturais e antropogênicos emitem metais para o ar e água (DEMIRBAS, 2001).

Dentre os metais pesados, o chumbo é um dos contaminantes ambientais mais comuns, sendo tóxico para homens e animais e, sem nenhuma função fisiológica, conhecida, no organismo. Entra no corpo, principalmente, por inalação ou ingestão, sendo diretamente absorvido e distribuído (MOREIRA, 2004; PIERANGELI et al., 2005)

A quantidade anual de chumbo que se dispersa como contaminante atmosférico é muito elevada. NRIAGU & PACYMA (1988) estimaram que a cada ano um total de 330 000 toneladas de chumbo são diretamente despejadas na atmosfera. Alguns autores consideram que somente 4% do chumbo emitido na atmosfera seja de fontes naturais (emissões vulcânicas, erosão, e depósitos naturais).

O chumbo ocorre como contaminante ambiental e as concentrações no meio ambiente cresceram de acordo com o aumento do seu uso industrial. Com o advento da Revolução Industrial, as concentrações de chumbo no meio ambiente elevaram-se de forma alarmante, principalmente devido à introdução de compostos orgânicos de chumbo (chumbo tetraetila), como aditivo para gasolina (MELLOR, 1967).

Nos últimos anos a demanda de chumbo tem sofrido uma mudança quanto ao tipo de sua utilização. Seu emprego como antidetonante na gasolina e em tintas tem diminuído bastante, porém seu emprego em processos industriais vem aumentando significativamente. Usa-se chumbo na fabricação de canos para conduzir a água, na fabricação de revestimento de cabos elétricos, de chapas para pias, cisternas, telhados e na indústria de acumuladores (DNPM, 2001).

O zinco é um dos mais importantes metais, muitas vezes encontrado em efluentes despejados pelas indústrias, principalmente nos processos que envolvem galvanização e fabricação de ligas metálicas (AHUJA et al., 1999).

O ferro, é utilizado extensivamente para a produção de aço, liga metálica para a produção de ferramentas, máquinas, veículos de transporte (automóveis, navios), como elemento estrutural de pontes, edifícios, e uma infinidade de outras aplicações (OLIVEIRA et al., 2006).

O ferro é o elemento mais pesado que se produz exotermicamente por fusão, e o mais leve produzido por fissão, devido ao fato de seu núcleo ter a mais alta energia de ligação por nucleon, que é a energia necessária para separar do núcleo um nêutron ou um próton. Portanto, o núcleo mais estável é o do ferro-56 (OLIVEIRA et al., 2006).

É encontrado na natureza fazendo parte da composição de diversos minerais, entre eles muitos óxidos, como o FeO (óxido de ferro II, ou óxido ferroso) ou como Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (óxido de ferro III, ou óxido férrico). Os números que acompanham o íon ferro diz respeito aos estados de oxidação apresentados pelo ferro, que são +2 e +3, e é raramente encontrado livre. Para obter-se ferro no estado elementar, os óxidos são

reduzidos com carbono, e imediatamente são submetidos a um processo de refinação para retirar as impurezas presentes (DNPM, 2001).

A questão ambiental é um ponto preocupante no setor dos metais pesados. A poluição ambiental nas indústrias de metais pode ser registrada nos diversos ramos da cadeia estrutural produtiva, especialmente nas áreas de concentração, fundição e refino. Na mineração, ocorrem modificações topográficas, provocando o aparecimento de processos erosivos e do assoreamento de recursos hídricos, da devastação vegetal e de emissões de partículas sólidas no ar. Durante os processos de concentração e lixiviação, os danos ambientais são causados pelos produtos químicos utilizados nos processos e são expelidos como rejeitos. Os setores de fundição e de refino são os mais afetados no meio ambiente, com liberação de uma grande quantidade de compostos sulfurosos e elementos traços lançados na atmosfera, hidrosfera e na litosfera. Dentre esses destacam-se: gases de dióxido de enxofre, dióxido de telúrio e arsênio (DNPM, 2001).

Os metais pesados em elevadas concentrações são considerados tóxicos ao homem, pois podem afetar drasticamente o sistema nervoso, o fígado, os ossos e podem bloquear os diversos grupos funcionais de enzimas vitais. Dentre os biosorbentes mais comuns são as algas marinhas, seguido de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BAIK et al., 2002).

### **3.1.5.3.2 Remoção de metais por biossurfactantes**

A contaminação dos solos por metais pesados surge como resultado das diversas atividades industriais, incluindo mineração, fundição de metais, produção de baterias automobilísticas, emissão de veículos e depósitos de resíduos industriais e a dispersão de cinzas provenientes dos processos de incineração (HONG et al., 2002).

A presença de metais pesados nos solos provoca sérios problemas uma vez que os mesmos não podem ser biodegradados, levando à contaminação dos sistemas biológicos e do subsolo pelo processo de lixiviação. Nos Estados Unidos, por exemplo, o chumbo se encontra presente em 15% dos terrenos contaminados, seguido de cromo, cádmio e cobre encontrados em cerca de 7-11% dos solos. Com a finalidade de reduzir os custos associados ao tratamento de solos contaminados por metais pesados, diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas e implementadas (MORRISON, 1983).

Existem duas tecnologias normalmente aplicadas ao tratamento de solos contaminados por metais. A primeira consiste em imobilizar os metais pesados numa matriz sólida fortemente ligada ao solo, minimizando a migração. Esta tecnologia, contudo, não consiste numa solução definitiva para o problema, considerando a impossibilidade de reaproveitamento do solo e a necessidade de monitoramento a longo prazo. A Segunda tecnologia promove a mobilidade do metal e sua migração para a fase líquida por desorção e solubilização. Esta tecnologia pode ser considerada uma solução permanente, permitindo ainda a reciclagem do solo remediado e conseqüentemente o reuso da terra. Normalmente, a lavagem do solo com ácidos e com agentes quelantes como o EDTA são as técnicas mais aplicadas. Contudo, a lavagem com ácidos leva a redução da fertilidade do solo e a alterações na composição química e física em virtude da dissolução de minerais (REED et al., 1996). A utilização de EDTA, por outro lado, é preocupante do ponto de vista de saúde e de segurança, em função da sua resistência à degradação. A dificuldade de recuperação do metal pesado do complexo metal - EDTA também restringe o uso desta técnica.

Uma solução em potencial para a remediação de solos contaminados por metais e óleos consiste no uso de surfactantes, os quais podem ser adicionados em soluções, facilitando a solubilização, dispersão e desorção dos contaminantes do solo, permitindo ainda sua reutilização. Vários surfactantes sintéticos têm sido avaliados em testes de descontaminação (ELLIS, et al., 1985; NASH et al., 1987). Por outro lado, a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem levado a pesquisas para utilização de biossurfactantes. Recentemente, a viabilidade dos biossurfactantes para a remoção de metais tem sido demonstrada (MULLIGAN et al., 2001). A natureza iônica desses agentes, bem como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades de superfície os tornam candidatos em potencial para a remoção de metais pesados contidos em solos e sedimentos. Para Mulligan et al., (1999) é possível a remoção de metais pesados pela utilização de varias concentrações de surfactante.

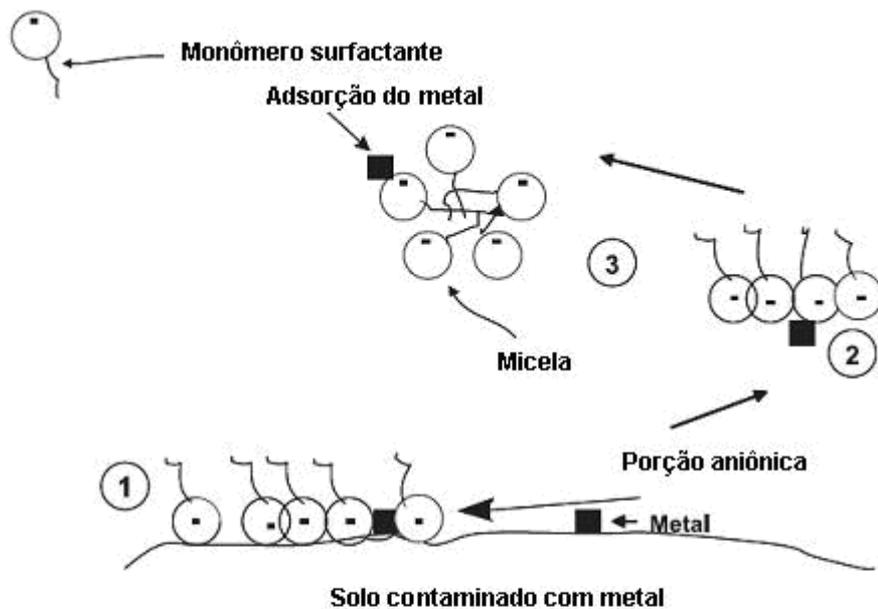
A figura 5 ilustra a remoção de metais por biossurfactantes iônicos ocorre na seguinte seqüência: (1) sorção do biossurfactante a superfície do solo e complexação com o metal, (2) destaque do metal através da interação eletrostática e (3) associação com as micelas do biossurfactante. Neste caso, os metais pesados ficam retidos nas micelas através de interações eletrostáticas, podendo ser facilmente recuperados por técnicas de separação por membranas (KITAMOTO et al., 2001).

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de utilização de surfactantes biológicos, destacando-se os estudos com surfactin e rhamnolipídios, de origem bacteriana, e de soforolipídeos originados de leveduras (MULLIGAN et al., 1999; HERMAN et al., 1995; OCHOA-LOZA, 1998; TAN et al., 1994; NEILSON et al., 2003).

Mulligan et al. (1999 a, b) utilizou surfactina de *Bacillus subtilis* para o tratamento de solos e sedimentos contaminados por Zn, Cu, Cd, óleo e graxa. Verificou que os metais pesados associados com carbonato, óxidos e frações orgânicas podem ser removidos usando uma combinação de surfactina e NaOH.

Maslin e Madier 2000 observaram que um biossurfactante do tipo rhamnolipídio pode diminuir a toxicidade e aumentar a degradação de poluentes orgânicos através de uma complexação de metais pesados.

Ochoa - Loza et al. (2001) observaram uma complexação de metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio por um mono rhamnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Peng et al., (2008) sugere que estes resultados podem ser bastante promissores na remoção de metais pesados em solos contaminados



1. Sorção do biossurfactante a superfície do solo e complexação com o metal
2. Remoção do metal do solo através da interação eletrostática
3. Associação com as micelas do biossurfactante

Figura 5 - Mecanismo para a remoção de metais por biossurfactante (Fonte: MULLIGAN, 2005)

#### 3.1.5.4. Aplicação na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes 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 (GUDINO, 2001). Um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (KIM et al., 2000).

Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos. O uso de raminolípídeos para melhorar as propriedades da manteiga, de croissants e de produtos de confeitaria congelados também foi reportado (CALVO et al., 2009).

A manoproteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode estabilizar emulsões água/óleo para produção de maionese, biscoitos, sorvetes, entre outros. É

produzida através de um processo biotecnológico simples, de larga escala e baixo custo. Além de ser estável em uma larga faixa de pH seu subproduto pode ser utilizado como ração animal (BENTO;GAYLARDE 1996).

Apesar da aplicação potencial, a indústria de alimentos não utiliza ainda os biossurfactantes como aditivos em larga escala. Muitas propriedades dos biossurfactantes, assim como sua regulamentação para aprovação como novo ingrediente para alimentos necessitam de aprovação.

### **3.1.5.5 Aplicação na indústria de higiene e cosméticos**

Os biossurfactantes são amplamente utilizados em vários produtos, como em cosméticos e em indústrias de medicamentos. Vários produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, incluindo dentre outros repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas e pasta de dentes (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000; BORDAS et al., 2000).

No setor da cosmética, observou-se uma rápida utilização dos biossurfactantes, estimando que no futuro próximo a maioria dos cosméticos seja "biocosméticos". Com essa finalidade, glicolípídeos obtidos de *Torulopsis bombicola* KSM 35 são usados no Japão, como agentes de limpeza facial. Alguns soforolípídeos foram utilizados comercialmente como umectantes quando incorporados em produtos de maquiagem. A KAO Co. LTDA desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolípídeos, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (DESAI; BANAT, 1997). A preparação de biossurfactantes por ação enzimática, principalmente por lípases, sobre moléculas hidrofóbicas deu uma nova dimensão à produção destes compostos, principalmente para aplicação em produtos de higiene e cosméticos (MANEERAT, 2005).

### **3.1.5.6 Aplicação na medicina**

Os biossurfactantes também têm sido utilizados em várias aplicações biológicas (terapêuticas) como atividade fungicida, bactericida, inseticida e antiviral e como inibidores de enzimas (MALIK, 2004; CALVO et al., 2009).

Alguns biossurfactantes além de suas propriedades detergentes podem apresentar em concentração baixa, forte ação desestabilizante de membranas e assim, conferir propriedade antimicrobiana (CARILLO et al., 2002). O interesse inicial pelos biossurfactantes foi originado pela propriedade antimicrobiana. Os dois

biossurfactantes mais bem estudados, ramnolípídeo e surfactina, foram primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968, respectivamente, por estas características (MAIER, 2003).

A chamada atividade anti-aderente, ou seja, a capacidade de inibir a adesão de microrganismos patogênicos em superfícies sólidas ou em sítios infecciosos também tem sido reportada em biossurfactantes, levando à diminuição de infecções hospitalares sem a necessidade de fármacos ou agentes químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006). Meylheuc et al. (2001) estudaram um biossurfactante obtido de *Pseudomonas fluorescens* dotado de propriedades inibidoras da adesão de *Listeria monocytogenes* LO28 as superfícies do politetrafluoroetileno e do aço inoxidável.

Os microrganismos empregam um mecanismo de sobrevivência pelo processo de adesão a superfícies e de formação de biofilmes. Eles se aderem à superfície através de complexos polissacarídicos, formando uma comunidade microbiana chamada biofilme, a qual protege seus habitantes de desidratação, de predadores, biocidas e outras condições ambientais extremas. No caso de obstrução da passagem do fluxo em dutos ou filtros e a corrosão, constituem problemas de ordem econômica para as indústrias de alimentos, petróleo e de manufaturados. Várias doenças, como fibrose cística, são causadas pela presença de biofilmes. Contudo, a modificação de uma superfície de um composto, leva a uma alteração permanente da superfície de modo que a afinidade da bactéria pela superfície condicionada seja reduzida ou aumentada quando comparada à superfície nativa (DAS et al., 2009). Velraeds-Martine et al. (1996) relataram a inibição da adesão de bactérias patogênicas por biossurfactante produzido por *Lactobacillus*. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes antiadesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes.

Várias bactérias têm sido reportadas como inibidoras da adesão de outras bactérias (ZAI RATE et al., 2006). Em contraste, produtos microbianos como biossurfactantes propiciam alterações na superfície à qual a bactéria irá se aderir, causando o processo de inibição. Conseqüentemente, podem ser aplicados como proteção de superfícies de instrumentos cirúrgicos onde a presença de microrganismos é indesejável (RODRIGUES et al., 2006).

Soforolípídeos de *Candida bombicola* têm sido estudados por sua atividade espermicida, citotóxica e anti-HIV, para reduzir a proliferação do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e a incidência de gravidez indesejada. Soforolípídeos também têm sido estudados como agentes antiinflamatórios para

doenças imunológicas. A atividade biológica de sete glicolípídeos microbianos na indução da diferenciação celular ao invés da proliferação de células cancerígenas (PAZ, 2005; RODRIGUES et al., 2006).

A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (PEYPOUX et al., 1999). Experimentos *in vitro* mostraram que a surfactina inativou eficazmente o vírus causador de herpes, assim como o retrovírus e outros vírus de RNA e DNA compactados. A atividade antiviral da surfactina foi determinada para uma larga gama de vírus. Os efeitos da surfactina na absorção de insulina em pulmão de ratos foram examinados (MUTHUSAMY et al., 2008).

Inibição da formação de coágulos e hemólise, formação de canais iônicos em membranas, atividade antitumoral e atividade antimicrobiana são algumas aplicações terapêuticas relacionadas aos biossurfactantes produzidos por várias espécies de *Bacillus* (ARIMA et al., 1966). O biossurfactante produzido por *Rhodococcus erythropolis* inibiu a multiplicação do vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (ROBERT et al., 1991).

### 3.1.5.7 Aplicação na agricultura

Biossurfactantes têm sido utilizados na formulação de pesticidas e herbicidas (MEYLHEUC et al., 2001). Os compostos ativos destas formulações são hidrofóbicos e agentes emulsificantes são necessários para dispersá-los em soluções aquosas (ROSENBERG; RON, 1999). Patel & Gopinathan (1986) relataram que biossurfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis.

Vários relatos tratam da eficiência de surfactantes sintéticos no controle da podridão do pepino e da pimenta causada por *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici* (STANGHELLINI et al., 1996). Em alguns experimentos foi observado que os ramnolípídeos de *Pseudomonas aeruginosa* em uma solução nutritiva, causaram lise em zoosporos (STANGHELLINI; MILLER, 1997). O biossurfactante apresentou atividade zoosporicida contra espécies de *Pythium*, *Phytophthora* e *Plasmopara* em baixas concentrações. A avaliação do controle biológico por um grupo de ramnolípídeos levou a conclusão que os biossurfactantes apresentam potencial para utilização no controle biológico de fitopatógenos. A Tabela 2 resume as principais aplicações comerciais para os biossurfactantes.

Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

<b>Funções</b>	<b>Campos de aplicação</b>
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

Fonte: BANAT et al., 2000

### 3.1.6 Produção de biossurfactantes utilizando resíduos industriais

Uma variedade de subprodutos, incluindo derivados de óleo vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas têm sido utilizados na produção de muitos metabólicos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 a 30% da matéria prima representa o custo total de um produto biotecnológico (UBEDA, 2004). Por outro lado, milhões de toneladas em resíduos poluentes são descartados a cada ano no mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam, um alto custo para várias indústrias (PANDEY et al., 2000). Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante, destacando os resíduos agro-industriais, como os do processamento dos óleos de soja, milho, coco, amendoim e canola, gorduras animais, açúcar de beterraba, sorgo, casca de soja, bagaço da cana-de-açúcar e resíduos do processamento de algumas frutas como maçã, banana e abacaxi (GALLERT; WINTER, 2002).

Pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos oleosos regionais demonstraram a produção desses compostos por espécies de *Candida* (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP, 2000, 2004; VANCE-HARROP et al., 2003; RUFINO et al., 2006). Outras descrevem a combinação entre óleos vegetais e carboidratos como substratos para a produção de biossurfactantes (DAVILA et al., 1992; ZHOU; KOSARIC, 1995; SARUBBO et al., 2006; LUNA et al., 2009).

Barros et al. (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria- prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactante é um dos passos para a viabilização e implantação desses processos em escala industrial, sendo necessário um balanço de nutrientes e condições adequadas para o desenvolvimento e produção. Os efluentes do processamento de batata foram evidenciados, como substitutos de substratos convencionais, como fontes de carbono e de nitrogênio, considerando a composição do meio, visando a redução da tensão superficial.

Nitschke e Pastore (2006) utilizaram com sucesso resíduos industriais de fritura de batata na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Anteriormente, Nitschke et al. (2004) selecionaram microrganismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais. Utilizaram melaço, soro de leite e manipueira obtendo valores

de tensão superficial em torno de  $26 \text{ mN m}^{-1}$ . Volbrecht et al. (1999) investigaram a produção de biossurfactantes usando óleo vegetal doméstico como substrato da bactéria *Tsukamurella sp.* DSM 44370, reduzindo a tensão da água de  $70 \text{ mN m}^{-1}$  para  $35 \text{ mN m}^{-1}$  com CMC de  $10 \text{ mg l}^{-1}$ . Haba et al. (2002) compararam o uso de óleo de oliva e girassol para a produção de biopolímeros usando valores de tensão superficial até  $40 \text{ mN m}^{-1}$  como critério de seleção de microrganismos potencialmente produtores. Rufino et al. (2008) utilizou um resíduo de refinaria na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* obtendo resultados satisfatórios em termos de tensão superficial.

Mukherjee et al. (2006) descreveram o uso de substratos de baixo custo como alternativa econômica e promissora para a produção de biossurfactantes. Derivados de óleo vegetal, substâncias a base de amido, soro de leite, óleo de babaçu e girassol, melão e efluente de arroz foram utilizados com eficiência na produção de raminolipídeos e sofrólipídeos por vários microrganismos.

Diferentes elementos encontrados nos efluentes dos processos industriais também são fontes de nutrientes. Nitrogênio, e ferro foram utilizados para aumentar o rendimento de biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 e *Ustilago maydis* (DUBEY et al., 2004).

Mercade et al. (1993) relataram a seleção de microrganismos capazes de utilizar resíduos de óleos lubrificantes para a produção de biossurfactantes. Dezoito amostras de solo contaminados por hidrocarbonetos, quarenta e quatro isolados diferentes foram capazes de crescer em meio contendo óleo lubrificante como fonte de carbono. Apenas 10% das espécies isoladas produziram biossurfactantes.

Sarubbo et al. (1997) avaliaram a produção de biossurfactante por duas linhagens de *Candida lipolytica* (UFPEDA 1055 e 1120) utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono.

Amezcua-Vega e colaboradores (2006) descreveram a importância da relação entre diferentes elementos como C e N, C e P, C e Fe ou C e Mg na produção de biossurfactantes e na otimização de seus processos de obtenção.

A borra oleosa do fundo de tanques da Petrobrás, contendo querosene, óleo diesel e petróleo, foi utilizada como matéria-prima de baixo custo para a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo contaminado (PIRÔLLO, 2006).

Tabela 3 - Matérias-primas de baixo custo e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes

<b>Matéria-prima de baixo custo ou resíduos</b>	<b>Tipo de biossurfactante</b>	<b>Espécie microbiana produtora</b>	<b>Rendimento máximo (g l<sup>-1</sup>)</b>
Óleo de babaçu	Glicolípídeo	<i>Candida lipolytica</i> IA1055	----
Óleo de milho	Glicolípídeo	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	4,0
Óleo de girassol e óleo de soja	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31/2,98
Óleo de soja	Lípídeo	<i>Candida</i> sp. SY16	9,5
Óleo residual de fritura (óleos de oliva e girassol)	manosileritritol Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	2,7
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11,72
Resíduo de refinaria de óleo vegetal de girassol	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	16
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Glicolípídeo	<i>Candida antarctica</i> e/ou <i>Candida apicola</i>	10,5/13,4
Soro e resíduo de refinaria	Raminolípídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	0,92
Efluentes do processamento de batatas	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	---
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e <i>Bacillus subtilis</i> LB5a	2,2 – 3,0

Fonte: MUKHERJEE et al., 2006

### 3.1.7 Perspectivas de Utilização

A economia de produção de todos os metabólitos microbianos vem sendo determinada por três fatores básicos: (i) custos da matéria-prima inicial; (ii) disponibilidade de procedimentos adequados e econômicos de produção e recuperação; e (iii), o rendimento de produção dos microorganismos produtores (PELLERIN et al., 1992; OCHOA-LOZA et al., 2001).

Nas últimas décadas, a produção de biossurfactantes por vários microorganismos tem sido intensivamente estudada, o que permite que se tenha, hoje, uma boa quantidade de dados em relação a sua produção, tipos e propriedades. Apesar de possuir muitas propriedades comercialmente atrativas e claras vantagens em comparação aos seus homólogos sintéticos, a produção de surfactantes microbianos em escala comercial ainda não foi completamente atingida devido aos seus baixos rendimentos e altos custos de produção, sendo necessária a inclusão da produção e recuperação de forma mais lucrativa e em grande escala industrial.

A produção mundial de óleos e gorduras é de cerca de 2 a 3 milhões de toneladas/ano, sendo 75 % derivados de plantas. A maioria dos óleos e gorduras é utilizada na indústria alimentícia, a qual gera grandes quantidades de resíduos graxos da extração das sementes oleaginosas. O acúmulo desses resíduos tem aumentado sua utilização para transformação microbiana (KOSARIC et al., 1996; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999b). Adicionalmente, a manipulação da composição do meio de cultura tem permitido o aumento da produção (CARRILLO et al., 1996; TULEVA et al., 2002).

Pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos oleosos regionais demonstraram a produção desses compostos por espécies de *Candida* (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP, 2000, 2004; VANCE-HARROP et al., 2003). Outras descrevem a combinação entre óleos vegetais e carboidratos como substratos para a produção de biossurfactantes (DAVILA et al., 1992; ZHOU; KOSARIC, 1993 e 1995; SARUBBO et al., 2006).

Considerando as inúmeras propriedades e a gama de aplicações dos biossurfactantes, torna-se necessário, o aprimoramento das técnicas existentes, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de produção, através de pesquisas que permitam a redução dos custos de produção e altos rendimentos, será possível identificar o uso em potencial dos biossurfactantes a nível industrial e competitivo em todo o mundo (MERCADÉ et al., 1997; OKPOKWASILI; IBIENE, 2006).

## REFERÊNCIAS

---

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria-Product characterization, and evolution. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v.2, n.4, p.315-324, 1991.

ANDRADE, R. F. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALBUQUERQUE, C.D; SARUBBO, L. A. ; CAMPOS-TAKAKI,G.M . Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.) Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, p. 701-705, 2009.

AHUJA, P.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. Zn<sup>2+</sup> Biosorption by *Oscillatoria angustissima*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 77-85, 1999.

ALBUQUERQUE, C.D.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; FILETI, A.M.F. On-line biomass estimation in biosurfactant production process by *Candida lipolytica* UCP 988, **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p.1367-5435, 2008.

AMEZCUA-VEJA, C.; POGGI-VARALDO, H.M.; ESPARZA-GARCIA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VAZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 237-240, 2006.

ARAGÃO, V.O.; ROCHA, L.L.; ANGELINA, A.L.; PAES, F.A.; HISSA, D.C.; PINTO, N.W.; MELO, V.M.M.M.; MARTINS, S.C.S. Leveduras degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC. 57. **Anais**. Fortaleza: SBPC, 2007.

ARIMA, K.Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 669-1672, 1969.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biosurfactante...

ARORA, D.K, ELANER, R.P.; MUKERJI, K.G. **Handbook of applied mycology fungal biotechnology**, New York: Marcel Dekker, v. 4, p.1114, 1992.

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

BAIK ,W.Y.; BAE, J.H.; CHO, K.M.; HARTMEIER, W. Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 167-170, 2002.

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

BANAT, I.M. Characterization of biosurfactant and their use in pollution removal state of the art (Review). **Acta Biotechnology**, n.15, p.251-267, 1995 (b).

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

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA, M.R, PASTORE, M.G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, n. 2, v. 30, p. 01-14, 2007.

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. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 38, p.31-33, 1996.

BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in soil. **Current Microbiology**, v.56, p.445-449, 2007.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biosurfactante...

BLOOMBERG, O. Designing proteins as emulsifiers. **Lebensmitteltechnologie**, v.24, p.130-131,1991.

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

BORDAS, F.; LaFRANCE, P. Utilisation de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d'un sol sableux contaminé 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.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ- LOPEZ. Application on bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes future prospects-Review. *Science of total environment*, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p.520-529, 1998.

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

CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETTI, A.M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.82-84, 1996.

CARRILO C.; TERUEL, J.A.; ARANDA, F.J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1611, p. 91-97, 2002.

LUNA, J.M.- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biosurfactante...

CZAPLICKA, M.; CHMIELARZ, A. Application of biosurfactants and non-ionic surfactants for removal of organic matter from metallurgical lead-bearing slime. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 645–649, 2009

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of biosurfactant from *Touropsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 1, v.47, 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.

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

COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, 58, 245-249, 2009.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotechnology: A text book of industrial microbiology. Madison: **Science Tech**, p.297, 1984.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p.183–186, 2009.

DAVILA, A.M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 6-11, 1992.

DEMIRBAS, A. Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. **Food Chemistry**, v. 75, p. 453-457, 2001.

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

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biossurfactante...

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**, (article in press), 2004.

DNPM, **Departamento Nacional de Produção Mineral**, Balanço Mineral Brasileiro, 2001, on-line. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/portal/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=65>.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Destillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactants production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 61-69, 2001

ELLIS, W.D.; PAYNE, J.R, MCNABB, G.D. Treatment of contaminated soils with aqueous surfactants. U.S. EPA 600/2-85/129, 1985

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

FOX, S.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus* using potato substrates. **Bioresourse Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 483-496, 2002.

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

GERSON, D.F. Biosurfactants: production - properties - applications. In: **Biotechnology**. KOSARIC, N. (ed.),1993.

GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.; DUARTE, M.S, SOUZA LIMA, G.M.; ARAUJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p.39-45, 2003

GUERRA-SANTOS, L.H.; KÄPPELI, O.; FIECHLER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 301-305, 1984.

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

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2002.

HERMAN, D.C.; ARTIOLA, J.F.; MILLER, R.M. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 2280–2285, 1995.

HITSATSUK, K.; NAKAHARA, T.; SANO, N.; YAMADA, K. Formation of a rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 35, p. 686-692, 1971.

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

HONG, K.J.; TOKUNAGA, S.; KAJIUCHI, T. Evolution of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. **Elsevier Science**, p. 381-384, 2002.

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, v.37. p.4143-4150, 2003.

HUE N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biossurfactante...

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TUMURA, O.; ARIMA, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 669-1672, 1969.

KIM, S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, TH. 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.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 187-201, 2002.

KITAMOTO, D.; YANGISHITA, H.; NAKAIWA, M.; NAKANE, T.; AKIYA, T. Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold thermal storage. **Biotechnology**, v.17, p. 362-365, 2001.

KOSARIC, N. Biosurfactants. In: Rehm HJ, Reed G, Puffier A, Stadler P(eds) **Biotechnology**, VCH, Weinheim, v.6,p. 659-717, 1996.

JAVERI, M.; JENNEMAN, G.E.; McINERNEY, M.J, et al. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.3, p.698-700, 1985.

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

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

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biosurfactante...

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 4, v. 52, p.785-793, 2009.

MARÍN, M.; PEDREGOSA, A.; RIOS, S.; LABORDA, F. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 69-75, 1996.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity. **Adv. Appl. Microbiology**, v. 52, p. 101-121, 2003.

MARÇAL, M.C.R. **Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meio suplementado por óleos vegetais (babaçu, coco e dendê)**1991. p.147. (Tese de Mestrado)- Departamento de Nutrição, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 1991.

MAYER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

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, 1999b.

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

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, p. 261-278, 2004.

MANEERAT, S. Biosurfactant from marine microorganisms. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.27, p.1263-1272, 2005.

MASLIN, P.; MADIER, R.M. Rhamnolipid- enhanced mineralization of phenanthrene in organic- metal co-contaminated soils. **Biorremediation journal**, v. 4, p. 295-308, 2000.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biossurfactante...

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

MELLOR, J.W. MELLORç S Modern Inorganic Chemistry, Longmans Green & Co. Ltd, 1967.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; ESPUNY, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v.43, p. 1-6, 1993.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agro industrial by products for biosurfactant production. **Journal of American Oil and Chemistry Society**, v. 71, p. 61-64, 1994.

MERCADE, M.E.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. The use of oil substrates for biosurfactant production. **Recent Res. Dev. Oil. Chem**, v. 1, p. 177-185. 1997.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, p. 167-181, 2004.

MORRISON, G.M.P. Urban storwater pollution: heavy metal studies of natural waters (a review). Research Report of Middlesex Polytechnic Research & Consultancy, Sweden, 1983

MUKHERJEE, S.; PALASHPRYA, D.A.; RAMKRISHNA, S.E.N. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C.N, GIBBS, B.F. Biosurfactants: production, properties, applications, 1993.

MULLIGAN, C.N.; YONG R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazard Materials**, v. 85, p.111-125, 2001.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biosurfactante...

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biolechnology**, v. 47, p. 23-29, 1990a.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 3812– 3820, 1990b.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation or contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

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

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**,v. 94, p. 736-746, 2008.

NASH, J.; TRAVER, R.P.; DOWNEY, D.C. "Surfactant enhanced in situ soil Washing". US.EPA HWERL. Edilsin. New Jersey, 1987.

NRIAGU, J.; PACYMA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature*, v. 333 p. 134-139, 1988.

NEILSON, J.W.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 899–908, 2003.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biosurfactant production by *B. subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, p. 163-172, 2004.

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

OCHOA-LOZA, F.J. Physico-chemical factors affecting rhamnolipid biosurfactant application for removal of metal contaminants from soil. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson, 1998.

OCHOA-LOZA, F.J.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of environmental quality*, v. 30, p. 479-485, 2001.

OKPOKWASILI, G.C.; IBIENE, A.A. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, p. 453-456, 2006.

OLIVEIRA, A.B.; NASCIMENTO, C.W.A. Formas de manganês e ferro em solos de referência de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30. p.99-110, 2006

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHEL, D.A. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process Biochem**, v. 35, p. 1135-1169, 2000.

PENG, J.-F.; SONG, Y.-H. ; YUAN, P.; CUI, X.-Y.; QIU, G.-L. The remediation of heavy metals contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 633-640 , 2008.

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

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, 1979.

PAZ, MC.F. Identificação e caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. 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, 2005.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent Trends in the Biochemistry of Surfactin. v. 51, p. 553-563, 1999.

PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; UCHIYAMA, H. Characterisation of aescin as a biosurfactant for environmental remediation. **J. Surfactants Detergents**, v. 2, p. 337-341, 1999.

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

PIERANGELI, M.A.P.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N. Effect of pH on cadmium adsorption and desorption in Brazilian Oxisols. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.4, p.523-532, 2006.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactante utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2006.

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.1321-324, 2003.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.;

BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n- alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresouruce Technology**, v. 90, p.159-168, 2003.

RAHMAN, K.S.M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants- Review. **Biotechnology**, v.7, p. 360-370, 2008.

REED, B.E.; CARRIERE, P.C.; MOORE, R.J. Flushing of a pb (II) contaminated soil using HCL, EDTA and Ca Cl<sub>2</sub>, J. **Environ**, v. 122, p. 48-50, 1996

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

ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; BOSCH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPINY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 871-874, 1989.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Optimización de la producción de biotensoativos por *Ipseudomonas aeruginosas* 44T1. **Grasas y Aceites**, Servilla, v. 42, n. 1, p. 1-7, 1991.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. Surface active polymers from the genus *Acinetobacter*. In: Kaplan DL(ed) *Biopolymers from renewable resouces*. Springer, Berlin Heidelberg New York. p. 281-291, 1999.

RODRIGUES, L.R.; BANAT, I.M.; VAN DER MEI HC.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 470-480, 2006

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants, **Environmental Microbiology**, 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.

RUFINO, R.D. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. Recife, 2006. Dissertação (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006, 95f.

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

SAINT-BLANQUANT, G. Effects nutritionnels des agents emulsificants utilisés en alimentation humaine. **Medicine and Nutrition**, Toulouse, v. 20, n. 6, p. 379-395, 1984.

SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.R.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Comparative study of bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 40, p. 707-720, 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. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 95, p. 59-67, 2001.

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**, v. 9, p. 400-406, 2006.

SING, M, SAINI, VS, ADHIKARI, DK, DESAI, JD. SISTA, V.R. Production of biomulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 12, n. 10, p. 743- 746, 1990.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biossurfactante...

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects. Biotechnol.** v. 25, p. 99-121, 2007

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

SOARES, M.R. **Coeficiente de distribuição de metais pesados em solos do estado de São Paulo**. Piracicaba- SP, 202p. 2004

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

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.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. 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 zoosporic spread of *Pythium aphanidermatum* in a reticulating hydroponic system. **Plant Dis.** n. 80, p. 422- 428, 1996.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants. Their identity and Potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plants Dis.** n. 81, p. 4-12, 1997.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biosurfactante...

TAN, H. ; CHAMPION, J.T. ; ARTIOLA, J.F.; BRUSSEAU, M.L. ; MILLER, R.M. Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 2402–2406, 1994.

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.

UBEDA, B.T. Estudo **da produção de biosurfactante pela bactéria Kocuria riphozila**. Campinas, Dissertação de Mestrado e Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2004, 98f.

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

VANCE-HARROP, M.H.V.; ROCHA, J.A.; SARUBBO, L.A.; CARNEIRO DA CUNHA, M.G.; CAMPOS-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. Caxambu, 03 a 06 de maio de 1997.

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 biosurfactantes. Recife, p.72. Dissertação (mestrado em Biologia de fungos). Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2000.

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.

VANCE-HARROP, M.H. Influência das fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biosurfactantes. Recife, 2000. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia de Fungos. Universidade Federal de Pernambuco, 2004, 100f.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

VELRAEDS, M.M.C.; VAN DER MEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactant released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces**, v. 8, p. 51-61, 1996.

VOLLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surfaceactive di-, tri- and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *T. sukamurella* spec. **Fett/LIPID**. v. 101, p. 389 – 394, 1999.

VAN HAMME, 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.

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, 2004.

ZAI RATE, G.; NADER-MACIAS, M.E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 43, p.174 –180, 2006

ZHOU, Q.H.; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology 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.

Fator de impacto: 1,796.

**OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE BAIXO-CUSTO FORMULADO COM RESÍDUO DE  
REFINARIA DE ÓLEO DE SOJA E MILHOCINA PARA A PRODUÇÃO DE  
BIOSURFACTANTES POR *CANDIDA SPHAERICA* UCP 0995**

**Juliana M. Luna<sup>a,b</sup>, Clarissa D.C. Albuquerque<sup>b,c</sup>, Leonie A.Sarubbo<sup>b,c</sup>, Galba M.  
Campos-Takaki<sup>b,c,\*</sup>**

*<sup>a</sup>Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP  
50.670-420, Recife-Pernambuco, Brasil*

*<sup>b</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco,  
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE,  
Brasil*

*<sup>c</sup>Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do  
Príncipe, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife- PE, Brasil*

\*Corresponding author. Tel.: +55 81 21194044; fax: +55 81 21194043.

E-mail addresses: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br) (G.M. Campos-Takaki), [juliana\\_mouraluna@yahoo.com.br](mailto:juliana_mouraluna@yahoo.com.br) (J.M. Luna), [leonie@unicap.br](mailto:leonie@unicap.br) (L.A. Sarubbo), [albqqs@yahoo.com.br](mailto:albqqs@yahoo.com.br) (C.D.C. Albuquerque)

## Resumo

Planejamentos fatoriais e metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimizar as concentrações de resíduo de refinaria do óleo de soja e milhocina em meio de baixo custo para produção de agentes surfactantes por *C. sphaerica* UCP 0995. Três planejamentos fatoriais completos  $2^2$  foram aplicados seqüencialmente para investigar os efeitos das concentrações e interações do resíduo de refinaria e da milhocina sobre a tensão superficial do líquido metabólico com 144 h, livre de células. Planejamento composto central  $2^2$  e metodologia de superfície de resposta foram empregados para obter um modelo estatístico dos efeitos do resíduo de refinaria do óleo de soja e da milhocina sobre a tensão superficial do líquido metabólico, com 144h, livre de células. A equação de regressão foi obtida a partir dos dados experimentais do planejamento composto central, a partir da análise dos gráficos de superfície de resposta, as concentrações ótimas dos componentes do meio foram determinadas: 8,63% (v/v) ( $\cong$  9% v/v) do resíduo da refinaria do óleo de soja e 8,80% v/v ( $\cong$  9% v/v) da milhocina. A tensão superficial mínima prevista e confirmada experimentalmente foi de 25,25 mN/m.

Palavras - chave: tensão superficial, planejamento fatorial, otimização, fermentação, biossurfactante.

## 1. Introdução

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção polar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto que a apolar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade óleo/água e água/óleo [1].

Surfactantes de origem microbiana ou biossurfactantes têm atraído a atenção devido à baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica desses compostos. No entanto, os biossurfactantes têm de competir com surfactantes de origem petroquímica em aspectos como custo, funcionalidade e capacidade de produção, para atender as necessidades da aplicação pretendida [2].

A otimização da composição do meio de cultivo constitui em uma solução de grande importância no desenvolvimento de processos de produção de biossurfactantes economicamente viáveis. A redução geral dos custos de produção de biossurfactantes geralmente depende de melhoramentos de espécies microbianas; da utilização de matérias-primas de baixo custo, tais como resíduos agrícolas e industriais, como substratos, da ampliação de escala do processo, como também do uso de técnicas computacionais avançadas para controle e otimização do processo [3]. Carboidratos e óleos vegetais estão entre os substratos mais utilizados para a produção de biossurfactantes. A seleção de substratos, entretanto, envolve a dificuldade em encontrar um resíduo com o correto balanço de carboidratos e lipídios para possibilitar o crescimento microbiano e a produção favorável de biossurfactante. Resíduos agroindustriais com elevados teores de carboidratos ou lipídios e resíduos urbanos possuem os requisitos para o uso como substratos para produção de biossurfactante [4]. O resíduo de refinaria de óleo de soja e a milhocina são dois

exemplos de resíduos agroindustriais de baixo custo e ricos em nutrientes que podem ser utilizados na produção de biossurfactantes para reduzir o custo do processo.

O método tradicional de variar um fator por vez para a otimização é demorado e incapaz de alcançar a condição ótima, devido principalmente a interação entre os fatores [5]. Planejamentos fatoriais de experimentos de otimização são especialmente adequados por levar em conta as interações entre as variáveis estudadas. Uma combinação de fatores que gera uma determinada resposta ótima pode ser identificada através do uso de planejamentos fatoriais e metodologia de superfície resposta (MSR) [6]. A otimização através de planejamento fatorial e MSR é uma prática comum no campo da biotecnologia para a otimização dos componentes de produção e condições do meio de cultura (Rao et al., 1993; Musial et al., 2004)[7-8]. Este método também foi aplicado com sucesso na otimização do meio de produção de biossurfactante [9-10-11-12-13-14].

O objetivo do presente estudo foi otimizar um meio de baixo custo utilizando resíduo da indústria de soja e de maceração de milho para a produção de biossurfactantes por *C. sphaerica* UCP 0995, utilizando planejamentos fatoriais e metodologia da superfície resposta. A propriedade física tensão superficial, convencionalmente usada para detectar a produção de biossurfactante foi usada como variável resposta.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Microrganismo*

A levedura *Candida sphaerica* (UCP 0995) isolada do solo contaminado por metais pesados do município de Belo Jardim [15], mantida em meio YMA (Yeast Mold Ágar) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco foi utilizada como microrganismo produtor do biossurfactante. Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

### *2.2. Resíduos Agroindustriais*

O resíduo de refinaria de óleo de soja foi utilizado como principal fonte de carbono, enquanto que a milhocina constituiu a fonte de nitrogênio. Ambos os subprodutos agroindustriais também proporcionaram os outros nutrientes essenciais para o metabolismo da levedura. A composição do resíduo de refinaria: 60% de material graxo, 35% de carboidatos, 2,7% de sódio, 0,080% de magnésio, 0,063% de potássio e 0,004% de zinco. A milhocina possui 21 a 45% de proteínas, 20 a 26% de ácido láctico, 8% de cinzas (com  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ), 3% de açúcares e um baixo teor de gordura (0,9-1,2%).

### *2.3. Produção de biossurfactante*

Todos os experimentos de otimização foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio base. O meio base foi composto por resíduo de refinaria de óleo de soja e milhocina dissolvidos em água destilada, em diferentes concentrações, de acordo com os planejamentos experimentais. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 ° C por 20 min. O pH dos meios foi ajustado para 5,3.

A cultura foi incubada por 24 horas a 28 °C sob agitação de 150 rpm. Cada Erlenmeyer (250 mL) contendo o meio base foi inoculado com 1% (v/v) da suspensão celular para atingir a concentração final de  $10^4$  células/mL. Os frascos foram incubados a 150 rpm, durante 144 horas a 27 °C. Em intervalos regulares, alíquotas foram retiradas para análises.

#### *2.4 Tensão superficial*

A tensão superficial foi determinada no líquido metabólico livre de células obtido por centrifugação a 10000 x g por 15 min, em tensiômetro automático (Modelo Sigma 70, KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de Nuoy em temperatura ambiente. As medições da tensão superficial da água destilada e do meio mineral foram usadas como controle.

#### *2.5. Otimização do meio de produção do biossurfactante*

Uma estratégia sequencial baseada na aplicação de planejamento experimental estatístico associado à MSR foi usada para otimizar a produção do biossurfactante por *C. sphaerica* UCP 0995.

A otimização do meio de produção foi realizada utilizando três planejamentos fatoriais completos  $2^2$  e um planejamento composto central  $2^2$ . Os planejamentos fatoriais completos foram realizados para verificar os efeitos e interações da milhocina e do resíduo de refinaria de óleo de soja sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células e o planejamento composto central  $2^2$  foi aplicado para determinar a concentração ótima de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja, utilizando os níveis mostrados nas Tabelas 1 e 2. Os níveis superior e inferior foram codificados como -1 e +1 e o ponto central foi codificado como 0 (zero). A relação entre os valores codificados e os valores reais encontra-se descrita na equação a seguir:

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

onde  $X_i$  é o valor codificado da variável independente,  $x_i$  é o valor real da variável independente,  $x_0$  é o valor real da variável independente no ponto central e  $\Delta x$  é o valor da variável.

Em todos os planejamentos, foram realizadas triplicatas no ponto central para proporcionar uma estimativa de erro segura. As triplicatas no ponto central também foram utilizadas para verificar a curvatura nos planejamentos fatoriais completos  $2^2$ . Os valores ótimos das concentrações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja foram obtidos pela resolução da equação de regressão e também pela análise da superfície resposta nos gráficos de contorno [16-17-18]. Para determinar a importância dos efeitos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com limites de confiança de 95%. Os efeitos e o nível de significância das variáveis foram graficamente ilustrados através de diagramas de Pareto. Um diagrama de Pareto consiste de barras com comprimento proporcional ao valor absoluto do efeito estimado, dividido pelo erro padrão. No diagrama de Pareto, os efeitos estimados são ordenados do maior valor absoluto para o menor valor absoluto. O diagrama inclui uma linha vertical no valor-t crítico para um alfa de 0,05. Os efeitos para os quais as barras são menores do que o valor-t crítico são considerados como não significativos e não afetam as variáveis resposta. Os efeitos podem ser positivos ou negativos. A análise de variância, a determinação dos coeficientes de regressão e a montagem dos gráficos foram realizadas com o software ®Statistica (Statsoft.Inc, E.U.A.) versão 6.0.

### 3. Resultados e discussão

Este trabalho descreve o uso de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja como componentes de um meio de baixo custo formulado para a produção de biossurfactantes por *C. sphaerica* UCP 0995. A produção foi detectada pela redução da tensão superficial após o cultivo do microrganismo em água destilada suplementada com milhocina e resíduo de refinaria de óleo de soja, em várias concentrações. O processo de otimização foi realizado usando três planejamentos fatoriais completos  $2^2$  seguidos por um planejamento composto central de dois níveis e dois fatores.

#### 3.1 Planejamentos Fatoriais Completos

Para verificar as concentrações ideais de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja para produção de biossurfactantes, inicialmente, um conjunto de três planejamentos completos  $2^2$  foram conduzidos para investigar os efeitos e as interações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja sobre a tensão superficial. As definições dos fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial encontram-se especificadas na Tabela 1. Os planejamentos experimentais realizados e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. O caminho ascendente foi utilizado para determinar a direção das menores tensões superficiais. Após o segundo planejamento, experimentos adicionais não conduziram a maiores reduções na tensão superficial.

#### 3.2. Primeiro planejamento fatorial completo

Os efeitos da milhocina e do resíduo de refinaria de óleo de soja sobre a tensão superficial, bem como a interação entre eles, nos primeiros planejamentos completos  $2^2$  são mostrados na Figura 1. O diagrama de Pareto mostra claramente que a concentração resíduo de refinaria de óleo de soja é, o fator que exerce maior efeito na

redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células, seguido da concentração de milhocina e da interação entre o resíduo de refinaria de óleo de soja e a milhocina. Como pode ser visto no diagrama de Pareto, o resíduo de refinaria de óleo de soja influenciou negativamente, com significância estatística, o aumento da tensão superficial, levando a valores mais baixos de tensão superficial. A concentração de milhocina também influenciou negativamente, com significância estatística, o aumento da tensão superficial, levando a valores mais baixos de tensão superficial. Por outro lado, a interação entre o resíduo de refinaria de óleo de soja e a milhocina contribuiu significativamente para o aumento da tensão superficial do meio de cultivo. A curvatura foi verificada, revelando falta de adequação da aproximação linear [17].

### ***Inserir figura 1***

#### ***3.3. Segundo planejamento fatorial completo***

Considerando os resultados do primeiro planejamento, as concentrações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja foram aumentadas de 6 para 12% (v/v), conforme ilustrado na Tabela 1. Os efeitos das concentrações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja sobre a tensão superficial, bem como a interação entre eles, no segundo planejamento fatorial completo  $2^2$  são mostrados na figura. 2. A interpretação do diagrama de Pareto mostra que a única variável significativa para a tensão superficial foi a concentração de milhocina. O aumento da concentração de milhocina exerceu uma influência negativa, do ponto de vista estatístico, sobre o aumento da tensão superficial, levando à redução dos valores de tensão superficial. Por outro lado, o aumento da concentração de resíduo de refinaria de óleo de soja, o efeito da curvatura e a interação entre a milhocina e o resíduo de refinaria de óleo de soja não foram estatisticamente significativos.

***Inserir figura 2***

***3.4. Terceiro planejamento fatorial completo***

Considerando os resultados do segundo planejamento, a concentração de milhocina foi aumentada de 9 para 15% (v/v), embora os níveis de resíduo de refinaria de óleo de soja não tenham sido modificados (Tabela 1). Como pode ser visto no diagrama de Pareto (Figura 3), a concentração de milhocina e a interação entre a milhocina e o resíduo de refinaria de óleo de soja produziram efeitos positivos estatisticamente significativos sobre o aumento da tensão superficial, levando à maior tensão superficial. Por outro lado, nas condições estudadas, a concentração de resíduo de refinaria de óleo de soja produziu um efeito negativo sobre o aumento da tensão superficial, mas este efeito não foi significativo estatisticamente. Embora o teste de curvatura tenha revelado falta de ajuste da aproximação linear, o efeito da curvatura também não foi estatisticamente significativo neste planejamento experimental.

***Inserir figura 3***

***3.5 Otimização do experimento***

A estratégia utilizada para atingir o objetivo deste trabalho foi explorar o espaço em torno das condições experimentais selecionadas através da análise dos resultados dos três planejamentos fatoriais previamente realizados. Após o terceiro planejamento fatorial completo, experimentos adicionais não foram capazes de reduzir ainda mais a tensão superficial do líquido metabólico livre de células. Tais resultados indicaram que as concentrações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja do segundo planejamento estavam próximas do ponto ótimo; portanto, um planejamento composto central  $2^2$  foi realizado para alcançar a menor tensão superficial do líquido metabólico livre de células e otimizar, assim, a composição do meio. Os níveis dos fatores

utilizados para o planejamento composto central  $2^2$  (Tabela 2) foram selecionados com base nos resultados dos planejamentos fatoriais completos  $2^2$  previamente realizados (Tabela 1). Os resultados obtidos do planejamento composto central estão apresentados na Tabela 4. Os experimentos mostraram que tensões superficiais reduzidas do líquido metabólico livre de células foram obtidas em todas as condições estudadas e que as tensões mais baixas do líquido metabólico livre de células foram encontradas nas condições do ponto central (nível zero – ensaios números 9, 10 e 11), onde o valor médio da tensão superficial foi igual a  $25,29 \pm 0,21$  mN/m.

Para explicar a dependência da tensão superficial em relação aos componentes do meio, os resultados obtidos a partir do planejamento composto central foram ajustados a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$z = 25.284 - 0.288x + 0.718x^2 + 0.004y + 0.374y^2 + 0.214xy \quad (2)$$

onde  $z$  é a resposta prevista da tensão superficial e  $x$  e  $y$  são os valores codificados de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja, respectivamente.

O modelo permitiu a avaliação dos efeitos lineares, quadráticos e combinados das variáveis independentes (concentrações de milhocina e resíduo de refinaria de óleo de soja) sobre a variável independente (tensão superficial). O significado de cada coeficiente da equação de regressão foi determinado pelo  $p$ -valores, que são representados graficamente no diagrama de Pareto ilustrado na Figura. 4. A análise dos resultados da Figura 4 mostra que a concentração de resíduo de refinaria de óleo de soja foi a variável com maior influência sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células. A contribuição quadrática do resíduo de refinaria de óleo de soja foi positiva e estatisticamente significativa. A contribuição linear do resíduo de refinaria de óleo de soja foi negativa, mas não foi estatisticamente significativa. A

contribuição quadrática da milhocina foi positiva e muito próxima da significância estatística. A contribuição linear da milhocina e da interação da milhocina com o resíduo de refinaria de óleo de soja foram positivas e estatisticamente significativas. Estes resultados também indicaram que as concentrações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja deveriam ser mantidas próximas do ponto central para se obter a máxima resposta.

#### ***Inserir figura 4***

A análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem (Equação 2) mostra que o modelo é significativo, como é evidente a partir do teste F de Fisher, onde o valor do F calculado ( $F_{\text{modelo}}=15,51$ ) é maior do que o valor do F tabulado ( $F_{\text{tab}} = 5,05$ ). O valor do coeficiente de determinação ( $R^2=0,87$ ) indica que 87% da variabilidade na resposta pode ser explicada pela equação de predição polinomial de segunda ordem, expressa na Equação 2, demonstrando a qualidade do ajuste do modelo. O valor do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{\text{ajust}}=0,73$ ) também indica a importância do modelo. Uma boa correlação entre os valores previstos e experimentais foi obtida uma vez que o coeficiente de correlação ( $R=0,93$ ) está próximo de 1. O modelo não apresentou falta de ajuste (FA), como é evidente a partir do teste F de Fisher, onde o valor do F calculado ( $F_{\text{FA}} = 4,08$ ) não é maior do que o valor do F tabulado ( $F_{\text{tab}} = 19,2$ ). Por meio da Equação 2, os valores ótimos codificados para o resíduo de refinaria de óleo de soja e para a milhocina foram respectivamente iguais a 0,210514 e -0,065631. Os valores ótimos correspondentes não codificados foram calculados como sendo iguais a 8,63% (v/v) e 8,80% (v/v), respectivamente. A tensão superficial mínima do líquido metabólico livre de células prevista nestas condições ótimas foi 25,25 mN/m. Estes resultados são apresentados graficamente na Figura 5,

através do gráfico tridimensional de milhocina e resíduo de refinaria de óleo de soja contra a tensão superficial no líquido metabólico livre de células.

### ***Inserir figura 5***

O modelo foi validado através da repetição dos experimentos, nas condições otimizadas, o que resultou em uma tensão superficial de  $25,34 \pm 0,16$  mN/m, provando assim sua validade. Para fins de simplificação, as concentrações de milhocina e de resíduo de refinaria de óleo de soja foram arredondadas para 9% (v/v). Novos experimentos foram então realizados para verificar o ótimo previsto. O resultado  $25,53 \pm 0,24$ mN/m) de três repetições (25,76; 25,29 e 25,5mN/m) foi coincidente com o valor previsto, mostrando mais uma vez a adequação do modelo.

A estratégia de otimização utilizando planejamentos fatoriais sequenciais também foi empregada em nossos laboratórios para aumentar a atividade dos agentes emulsificantes produzidos por *C. lipolytica* utilizando resíduo de refinaria de óleo de soja como substrato. Um planejamento fatorial completo foi utilizado para avaliar o efeito das concentrações do resíduo, de ácido glutâmico e de extrato de levedura. Verificou-se que o aumento das concentrações de resíduo e de ácido glutâmico provocou a redução da tensão superficial, que atingiu valores em torno de 25,29 mN/m [14]. Em outro trabalho, o biossurfactante de *C. sphaerica* cultivada em um meio de baixo custo formulado com 5% de resíduo de refinaria de soja e 2,5% de milhocina como substratos reduziu a tensão superficial para valores em torno de 26 mN/m após 144 h [19], enquanto que o biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em um meio mineral suplementado com o mesmo resíduo de refinaria usado neste trabalho reduziu a tensão superficial para 32 mN/m [20].

Modelos adequados foram criados para descrever a resposta dos experimentos para a produção de biossurfactantes por bactérias probióticas. A substituição do

material sintético pelo meio alternativo mais barato, formulado com soro de queijo e melão permitiu um aumento de cerca de 1,2-1,5 vezes o rendimento do biossurfactante produzido e uma redução de 60-80% dos custos de preparação dos meios [12]. Ferramentas de planejamento experimental foram utilizadas para estudar os efeitos das condições do processo de produção de surfactante usando uma estirpe de *Pseudomonas alcaligenes* cultivada de óleo de palma como única fonte de carbono. O procedimento de seleção mostrou que a produção do surfactante depende principalmente da concentração de óleo de palma, com uma redução na tensão superficial de 54 para 31 mN /m em 48 horas [21].

Parâmetros importantes para a produção de biossurfactante por *Serratia* sp. SVGG16 também foram selecionados através de planejamentos experimentais. Os resultados demonstraram que esta linhagem foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 34 mN /m [22-23-24].

#### **4. Conclusões**

A associação de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta provou ser efetiva para a otimização do meio para produção de biossurfactantes. Os resultados dos três planejamentos fatoriais completos  $2^2$  e do planejamento composto central com dois fatores mostraram a habilidade da *Candida sphaerica* crescer em meio de baixo custo constituído por resíduo de refinaria de óleo de soja e por milhocina e de produzir surfactante com potencial de aplicação em uma variedade de campos, especialmente em biorremediação.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem às agências financiadoras FACEPE, CAPES, CNPq, FINEP, PRONEX e a UNICAP, pelo uso de suas instalações.

## 5. Referências

1. Christofi N, Ivshina, IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. J Appl Microbiol 2002; 93: 915-29.
2. Van Hamme JD, Singh A, Ward OW. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol Adv 2006; 24: 604-620.
3. Campos-Takaki GM, Sarubbo LA, Albuquerque CDC. Environmentally Friendly Biosurfactants Produced by Yeasts. In Ramkrishna Sen, Biosurfactant. Austin: Land Bioscience, 2009. .
4. Mercade ME, Manresa MA. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. JAOCS 1994; 71: 61-64.
5. Haaland PD. Experimental Design in Biotechnology, Dekker, New York, 1989; 435-440.
6. Khuri AI, Cornell JA. Response surfaces: designs and analyses. Dekker, NewYork, 1987.
7. Rao PV, Jayaraman K, Lakshmana CM. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration, Proc Biochem 1993; 28: 391-395.

8. Musial I, Rymowicz W, Cibis E, 2004. Optimization of single-cell biomass production by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology and pulse method, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 2004; **7**.
9. Albuquerque CDC, Fileti AMF, Campos-Takaki GM. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method, *Can J Microbiol* 2006; 52: 75-583.
10. Albuquerque CDC, Campos-Takaki GM, Fileti AMF. On-line biomass estimation in biosurfactant production process by *Candida lipolytica* UCP 988, *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35: 1367-5435.
11. Rodrigues LR, Teixeira JA, Oliveira R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem Eng J* 2006; 32: 135-142.
12. Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav, Nerurkar A, Desai AJ. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Biores Technol* 2008; 99: 195-199.
13. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Sivachidambaram P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci* 2008; 94: 737-746.
14. Rufino RD, Sarubbo LA, Neto BB, Campos-Takaki GM. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*, *J Ind. Microbiol Biotechnol* 2008; 35: 907–914.

15. Brandão LVC. Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Candida*, isoladas de solo de mata e solo poluído com chumbo. tese (doutorado) UNESP 2001
16. Montgomery DC. Design and analysis of experiments, Wiley, New York 1997.
17. Box GEP, Drapper N R. Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses, second ed., Wiley, New York, 2007.
18. Adinarayana K, Ellaiah P. Respons. surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. J Pharm Sci 2002; 5: 272-278.
19. Puri S, Beg QB, Gupta R. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. Cur Microbiol 2002; 44: 286-290.
20. Sobrinho HBS, Rufino RD, Luna JM, Salgueiro AA, Campos-Takaki GM., Leite LFC, Sarubbo LA. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. Process Biochem 2008; 43: 912-917.
21. Rufino RD, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate, World J Microbiol Biotechnol 2007; 23: 729-734.
22. Oliveira FJS, Vazquez L, Campos NP, França FP. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. Process Biochem 2009; 44: 383-389.

23. Cunha CD, Rosado AS, Leite SGF. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochem.* 2004; 39: 2277-228.

24. Chen CH. Optimizing the concentration of carbon, nitrogen and phosphorus in a citric acid fermentation with response surface method, *Food Biotechnology* 1996; 10: 13-27.

Fig. 1. Primeiro planejamento fatorial completo  $2^2$  - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.

Fig. 2. Segundo planejamento fatorial completo  $2^2$  - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.

Fig. 3. Terceiro planejamento fatorial completo  $2^2$  - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.

Fig. 4. Planejamento composto central - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) resíduo de soja e (2) milhocina, utilizando tensão superficial como variável resposta. O ponto em que as estimativas de efeito são estatisticamente significativas ( $p = 0,050$ ) é indicado pela linha tracejada.

Fig. 5. Superfície de resposta da tensão de superficial mostrando a interação entre as concentrações resíduo de óleo de soja e milhocina.

**Tabela 1**Níveis e valores das variáveis independentes dos planejamentos fatoriais completos 2<sup>2</sup>

<b>Primeiro Planejamento Fatorial Completo</b>			
<b>Fator</b>	<b>Nível</b>		
	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
<b>Resíduo (%v/v)</b>	0	3	6
<b>Milhocina(%v/v)</b>	0	3	6
<b>Segundo Planejamento Fatorial Completo</b>			
<b>Fator</b>	<b>Nível</b>		
	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
<b>Resíduo (%v/v)</b>	6	9	12
<b>Milhocina (%v/v)</b>	6	9	12
<b>Terceiro Planejamento Fatorial Completo</b>			
<b>Fator</b>	<b>Nível</b>		
	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
<b>Resíduo (%v/v)</b>	6	9	12
<b>Milhocina (%v/v)</b>	9	12	15

**Tabela 2**

Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento composto central  $2^2$

<b>Planejamento Fatorial Central</b>					
<b>Fator</b>	<b>Níveis</b>				
	<b>-1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
<b>Resíduo (%v/v)</b>	3,68	5	8	11	12,32
<b>Milhocina (%v/v)</b>	4,68	6	9	12	13,32

**Tabela 3**

Valores codificados e resultados de tensão superficial dos planejamentos fatoriais completos 2<sup>2</sup>

Ensaio	Resíduo *	Milhocina *	Tensão superficial (mN/m)		
			Primeiro Planejamento Fatorial	Segundo Planejamento Fatorial	Terceiro Planejamento Fatorial
1	-1	-1	68,64	25,50	25,17
2	1	-1	27,92	25,46	24,15
3	-1	1	46,86	25,09	25,46
4	1	1	25,23	25,29	26,11
5	0	0	30,55	25,25	25,29
6	0	0	29,92	25,23	25,37
7	0	0	29,29	25,14	25,40

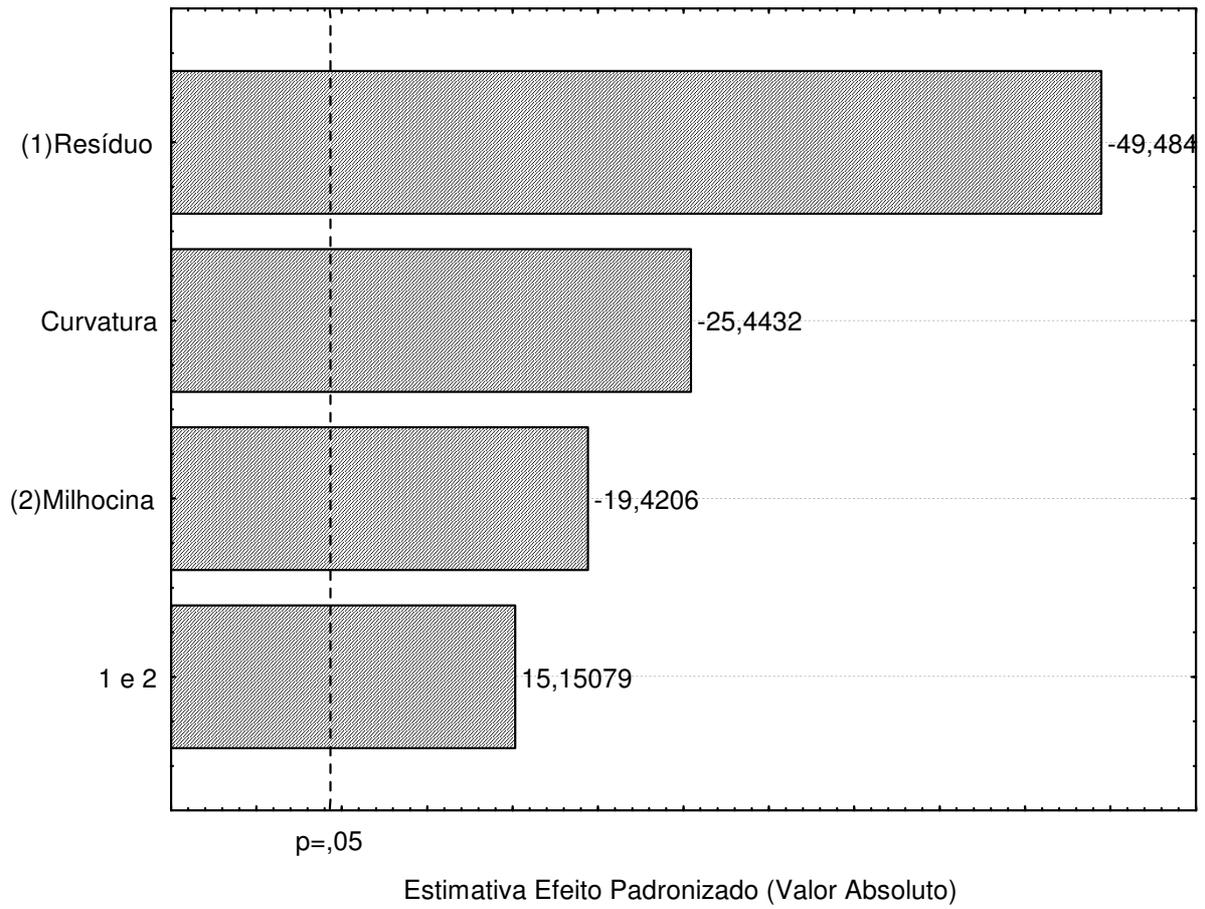
\* As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: primeiro planejamento - resíduo, 0% (-1), 3%(0) e 6% (+1); milhocina, 0%(-1), 3%(0) e 6% (+1). Segundo planejamento-- resíduo, 6% (-1), 9%(0) e 12% (+1); milhocina, 6%(-1), 9%(0) e 12% (+1). Terceiro planejamento- - resíduo, 6% (-1), 9%(0) e 12% (+1); milhocina, 9%(-1), 12%(0) e 15% (+1).

**Tabela4**

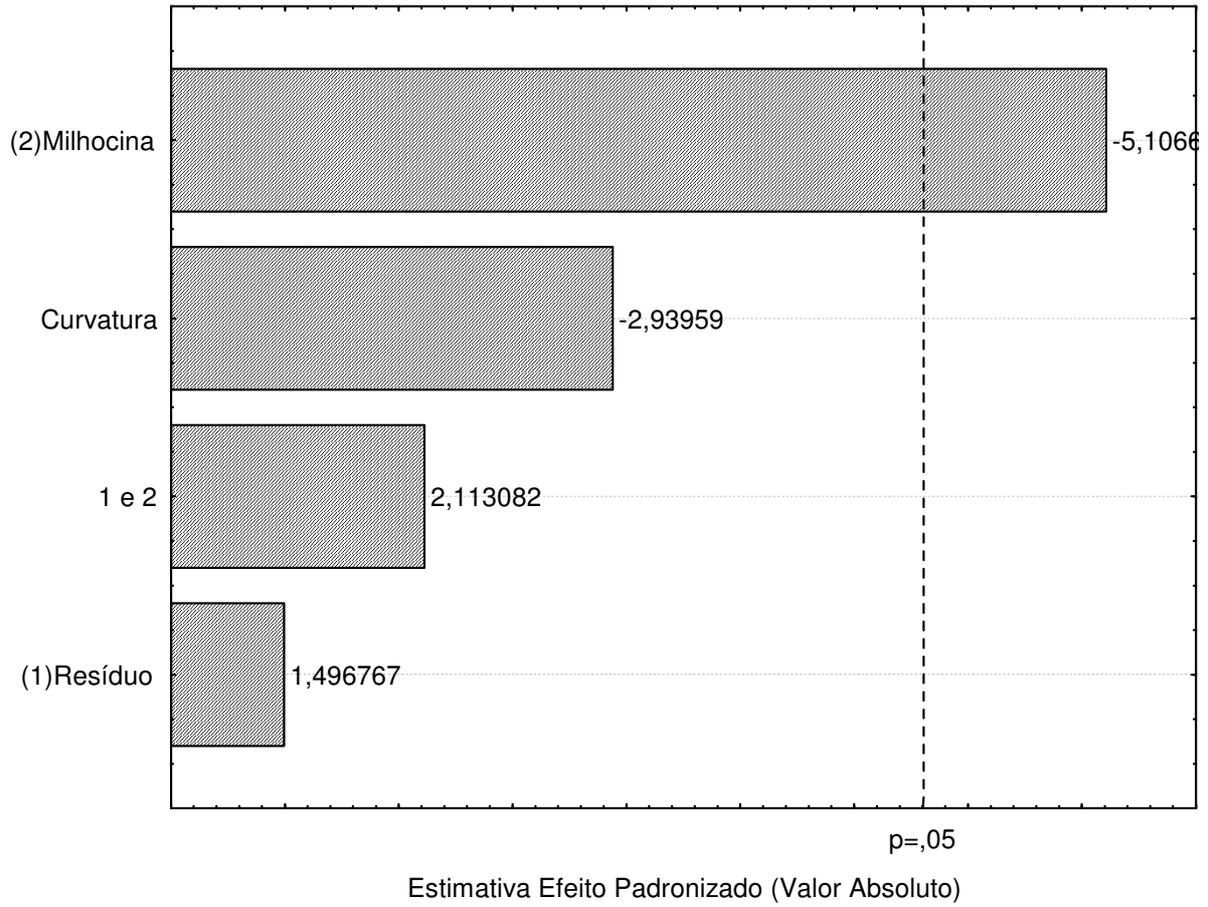
Valores codificados e resultados de tensão superficial do planejamento composto central 2<sup>2</sup>

Ensaio*	Resíduo*	Milhocina	Tensão superficial (mN/m)
			26,715
1	-1	-1	26,090
2	+1	-1	26,505
3	-1	+1	27,350
4	+1	+1	27,250
5	-1,41	0	25,900
6	1,41	0	26,035
7	0	-1,41	25,750
8	0	1,41	25,505
9	0	0	25,095
10	0	0	25,255

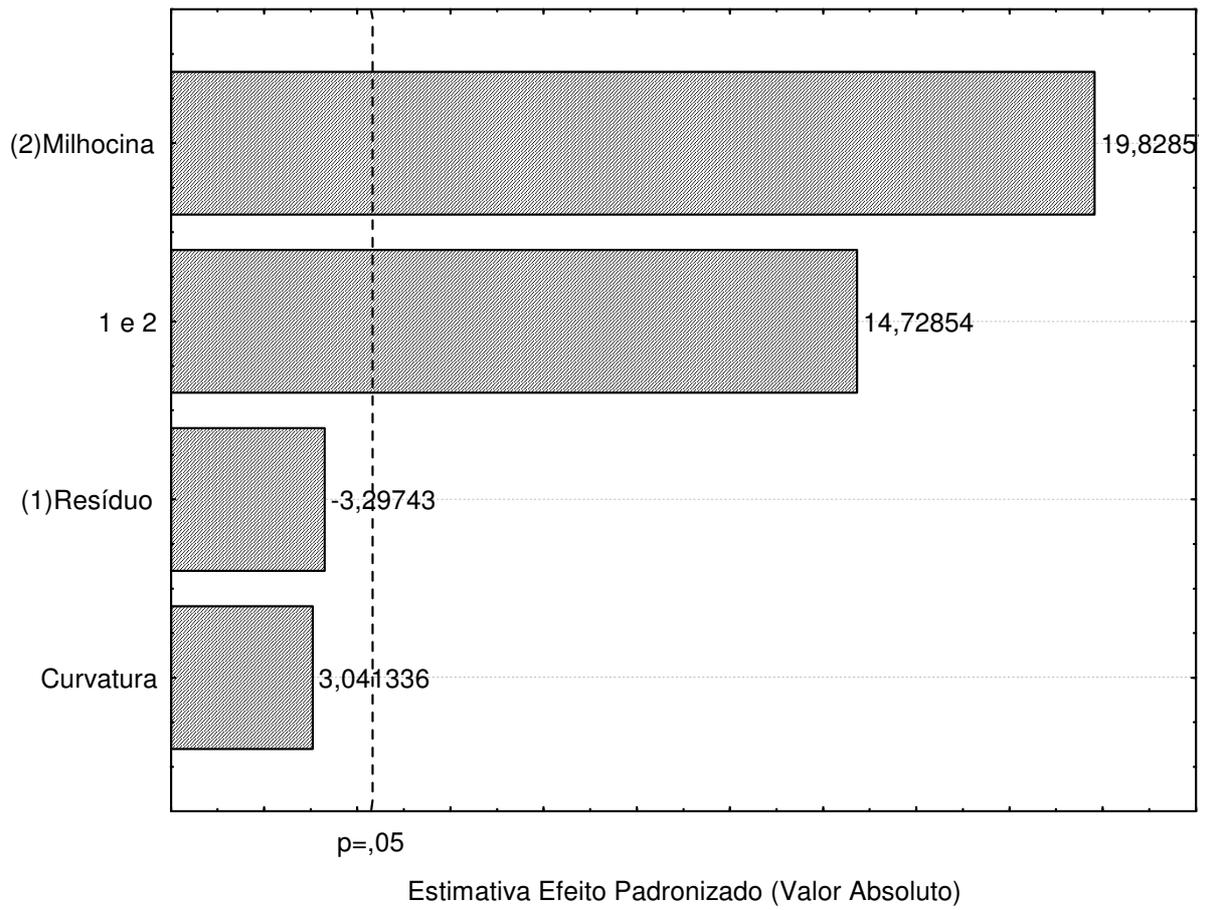
\*As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: resíduo, 3,68% (-1,41),5%(-1),8%(0),11%(+1), 12,32% (+1,41); milhocina, 4,68% (-1,41),6%(-1),9% (0),12%(+1), 13,32% (+1,41)



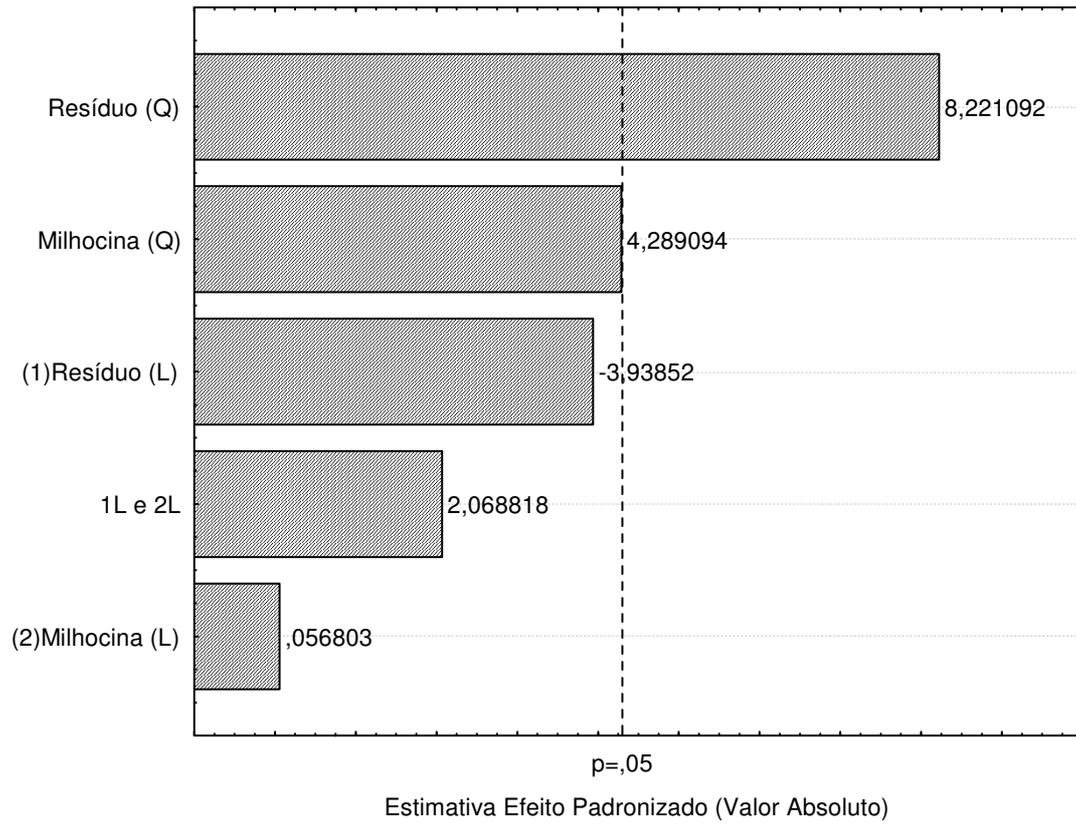
**Figura 1**



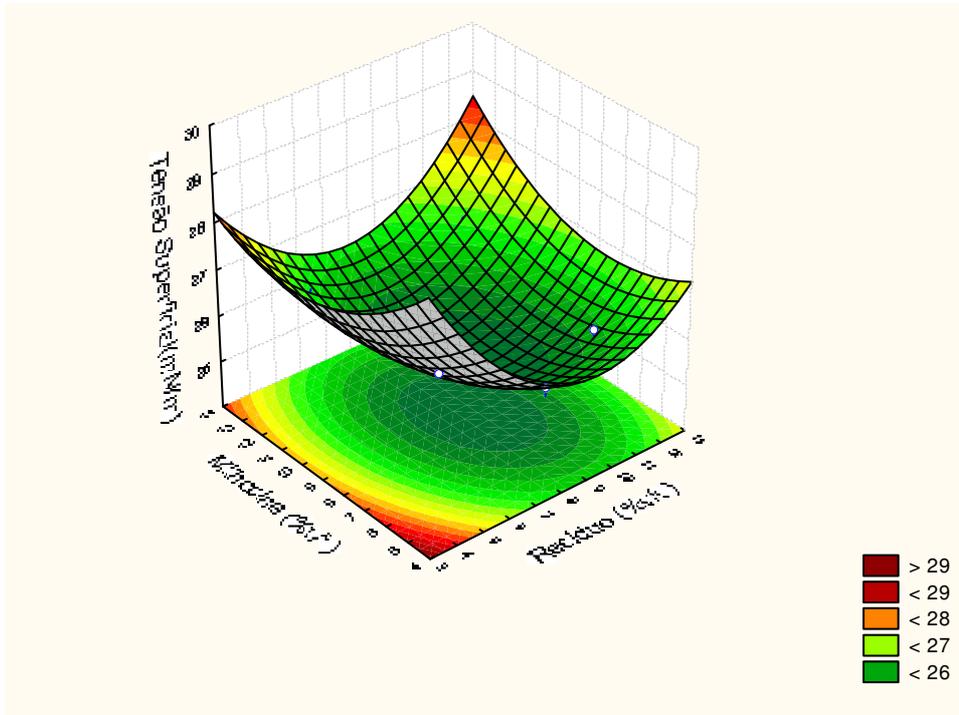
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

**Artigo 2**

**Manuscrito a ser submetido ao Periódico Internacional: Journal Applied Microbiology**

Fator de impacto:1,51

## **Lunasan: um novo biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* UCP 0995**

J. M. Luna,<sup>1,3</sup> L. A. Sarubbo<sup>2,3\*</sup> and G.M. Campos-Takaki<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) - UNICAP, Rua Nunes Machado, n. 42, Bloco J, Boa Vista, CEP: 50050-590, Recife-PE, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Ciências e Tecnologia,- Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, Boa Vista, Recife-PE, Brasil

\*Autores para correspondência: Tel.: +55-81-21194044, Fax: +55-81-21194043, E-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br); [leonie@unicap.br](mailto:leonie@unicap.br)

## RESUMO

O desenvolvimento de surfactantes biodegradáveis e menos tóxicos, como os biossurfactantes microbianos, torna-se uma estratégia importante na obtenção de compostos compatíveis com o meio ambiente. Muitos têm sido produzidos embora poucos sejam comercializados em virtude de alto custo de produção desses compostos e dos processos de purificação. Nesse trabalho, foi utilizado o meio otimizado contendo água destilada suplementada com 9% de resíduo industrial e 9% de milhocina como substratos para a produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica*. O rendimento do biossurfactante isolado foi de 9g/L. O biossurfactante Lunasan demonstrou uma excelente capacidade de redução de tensão superficial (25 mN/m) e baixo valor de CMC (0,025%), estabilidade térmica e a diferentes pHs relacionadas a capacidade de emulsificação e redução da tensão superficial, além de tolerância a condições salinas. Testes de hidrofobicidade sugeriram a utilização de dois mecanismos de transferência para os substratos, ou seja, ingestão interfacial direta e transferência mediada pelo biossurfactante. A caracterização do biossurfactante indicou sua natureza aniônica e a presença de 70% de lipídeos e 15% de carboidratos, sugerindo uma estrutura glicolipídica. Os resultados obtidos com a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*, nas condições testadas acima, demonstram propriedades promissoras para aplicação na biorremediação de compostos hidrofóbicos.

**Palavras - chave:** Biossurfactantes. *Candida sphaerica*. Resíduos industriais. Hidrofobicidade celular.

## Introdução

Os surfactantes constituem um grupo de agentes que atua nas superfícies através da capacidade em reduzir a tensão superficial e interfacial dos líquidos. Os biossurfactantes são compostos biológicos produzidos por uma grande variedade de microrganismos procariontes e eucariontes. Assim como seus similares sintéticos possuem em sua estrutura molecular porções hidrofílicas (polares) e hidrofóbicas (apolares), sendo por isso considerado moléculas anfipáticas que permitem a formação de estruturas especializadas, vitais à sua ação (Singh *et al.* 2007). A parte polar ou hidrofílica de um surfactante é conhecida geralmente como a “cabeça” e a parte hidrofóbica ou apolar é conhecida como a “cauda” (Maneerat 2005; Muthusamy *et al.* 2008).

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes são metabólitos produzidos principalmente, por bactérias e leveduras, embora alguns fungos também os produzam. Esses compostos, em função de suas biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente, ao contrário dos similares petroquímicos (sintéticos), têm sido cada vez mais estudados (Gautam and Tyagi 2006; Zai Rate *et al.* 2006). Os biossurfactantes apresentam, ainda, inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixa toxicidade, estabilidade frente à ampla faixa de pH e sob temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (Singh *et al.* 2007). Os tipos de estrutura e as quantidades de biossurfactantes produzidas são determinados a partir da escolha e concentração do(s) substrato(s) utilizado(s), que podem ser solúveis e insolúveis, bem como pela concentração de íons como P, N, Mg, O e Fe no meio de cultura, além das condições de cultivo (Soon *et al.* 2004).

A produção de biossurfactantes apresenta alguns aspectos limitantes quando comparada com a produção de surfactantes químicos, já que o custo de produção é cerca de 50 vezes maior. Assim, o sucesso da produção industrial de biossurfactantes irá depender do desenvolvimento de processos mais econômicos (Cortis and Ghezzehei 2007).

Nesse contexto, o processo fermentativo possui a chave para reduzir os custos do processo, no que se refere à utilização de substratos alternativos, uma vez que estes representam cerca de 30 % do custo total. Na procura de substratos de baixo custo, os resíduos industriais surgem como promissores (Luna *et al.* 2009). A produção

mundial de óleos e gorduras é de cerca de 2,5 a 3 milhões de toneladas/ano, sendo 75 % derivados de plantas. A maioria dos óleos e gorduras é usada na indústria alimentícia, a qual gera grandes quantidades de resíduos graxos da extração das sementes oleaginosas. O acúmulo destes resíduos tem aumentado a utilização destes materiais para transformação microbiana (Calvo *et al.* 2009).

Em geral, substratos agroindustriais que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos suprem a necessidade de fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (Tompson *et al.* 2000; Sarubbo *et al.* 2006; 2007). Assim, a utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento (Mulligan 2005). Considerando que o Brasil é um país essencialmente agrícola, a facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais é bastante significativa, motivando as pesquisas nessa área. Nesse sentido, o uso de substratos de baixo custo aliado à capacidade biossintética de bactérias e leveduras representa uma alternativa econômica de produção de biopolímeros com potencial de aplicação na indústria petrolífera.

Portanto, o presente trabalho foi desenvolvido visando produzir surfactantes a partir de *Candida sphaerica* UCP 0995 utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo, através do estudo da cinética de crescimento e de produção, bem como pelo estudo das propriedades do biossurfactante obtido, seu isolamento e caracterização preliminar.

## **Materiais e Métodos**

### *Microorganismo*

A *Candida sphaerica* (UCP 0995), utilizada como microrganismo produtor de biossurfactante, isolada do solo contaminado por metais do município de Belo Jardim (Brandão 2001) mantida em meio YMA (Yeast Mold Ágar) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

### *Substratos*

Dois resíduos industriais foram utilizados como substratos para a produção do biossurfactante. Um resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal de soja, gentilmente cedido pela ASA LTDA, Recife-PE, foi utilizado como substrato insolúvel, enquanto que a milhocina, resíduo da fabricação de produtos à base de milho, gentilmente cedido pela Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, foi utilizado como substrato solúvel.

O resíduo de refinaria de óleo de soja constituiu a principal fonte de carbono, enquanto que a milhocina constituiu a fonte de nitrogênio. Ambos os resíduos também contribuíram para o fornecimento de outros nutrientes importantes para o metabolismo do microrganismo. A composição do resíduo de refinaria apresenta 60% de material graxo, 35% de carboidratos, 2,7% de sódio, 0,08% de magnésio, 0,063% de potássio e 0,004% de zinco. A milhocina possui entre 21 a 45 % de proteínas, 20 a 26 % de ácido láctico, cerca de 8 % de cinzas (contendo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , etc.), cerca de 3 % de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9-1,2 %), de acordo com a literatura (Cardinal and Hedrick, 1947; Akhtar *et al.* 1997).

### *Meio de produção*

Para a produção do biossurfactante denominado de “Lunasan” foi utilizado o meio otimizado por Luna *et al.* (2008), contendo 9% de resíduo da indústria de óleo de soja e 9% de milhocina. O meio foi esterilizado em autoclave 121°C por 20 minutos, sendo o pH final de 5,3.

### *Produção do biossurfactante*

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas em frascos de Erlenmeyer com 500 ml de capacidade contendo 100mL do meio de produção e incubados com a suspensão celular de  $10^4$  células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 144 horas, à temperatura de 27°C. Alíquotas foram coletadas ao longo do cultivo para as seguintes determinações: biomassa, pH, tensão superficial e rendimento em biossurfactante.

### *Cinética de crescimento*

O crescimento foi acompanhado através da contagem de células em Câmara de Neübauer e peso seco. A contagem em Câmara de Neubauer foi realizada ao longo da fermentação a partir de alíquotas do líquido metabólico, o qual foi diluído quando necessário. O resultado da contagem foi expresso como células/mL. Para determinação da biomassa por peso seco, 10 mL das amostras foram centrifugados a 2000g durante 20 minutos, sendo a biomassa lavada com água destilada em tubo de centrífuga graduado. Após agitação e nova centrifugação, a fase superior foi descartada, e o “pellet” celular seco em estufa a 105 °C por 24 horas e pesado (García-Ochoa and Casas 1999).

### *Determinação da atividade de emulsificação*

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras foram centrifugadas a 2000g durante 20 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia proposta por Cooper and Goldenberg (1987) onde 1,0 mL de um hidrocarboneto (óleo de motor, óleo de milho, óleo de algodão, n-hexadecano ou querosene) foi adicionado a 1,0 mL do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação, em tubos graduados e agitados em vortex durante um minuto. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas, e o índice de emulsificação (E) foi calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor multiplicado por 100. Todas as análises foram feitas em triplicata.

### *Estabilidade dos agentes surfactantes (efeito do pH, da adição de NaCl e da temperatura)*

Os efeitos de diferentes temperaturas (5°C, 70°C, 100 °C e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) e de diferentes pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12) na tensão superficial do biossurfactante foram avaliados no líquido metabólico livre de células para determinação da estabilidade da atividade surfactante e da atividade de emulsificação (CAMEOTRA; MAKKAR 1998; KIM et al., 2000). Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### *Isolamento do biossurfactante*

Após 144 horas de cultivo da *Candida sphaerica* na condição selecionada, o líquido metabólico livre de células foi submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com HCl 6M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso durante 24 horas a -15°C, as amostras foram centrifugadas à 4000g por 30 minutos, lavadas com metanol gelado por duas vezes e secas em estufa a 37°C por 24-48 h, até secagem, e mantidas em dessecador até peso constante, sendo o rendimento em produto isolado calculado em g/L. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### *Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)*

A tensão superficial e a CMC foram medidas de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina *et al.* (2001), em tensiômetro automático (Modelo Sigma 70, KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de NUOY. A CMC foi determinada, partindo-se de uma solução de concentração conhecida do biossurfactante isolado.

#### *Determinação da Tensão Interfacial*

A tensão interfacial foi medida contra o n-hexadecano no líquido metabólico livre de células (após a remoção das células com Millipore 0,45µm). A tensão foi considerada alta para valores acima de 18mN/m e abaixo para valores abaixo de 7mN/m .

#### *Composição química do biossurfactante*

A concentração de proteína do biossurfactante isolado foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovina como padrão. Os carboidratos foram determinados pelo método ácido fenol-sulfúrico, usando D-glicose

como padrão (HANSON et al. 1981) e os lipídios quantificados de acordo com Manocha *et al.* (1980).

#### *Determinação da hidrofobicidade celular*

A hidrofobicidade celular foi medida pela aderência celular a hidrocarbonetos. As células foram lavadas duas vezes com água deionizada estéril e ressuspendidas em tampão salino (16,9 g/L  $K_2HPO_4$ , 7,3 g/L  $KH_2PO_4$ ) para fornecer uma D.O. de 0,5 a 600 nm. A 2,0 mL da suspensão celular foram adicionados 100 mL de n-hexadecano em tubo de ensaio (10x100mm), sendo o conteúdo agitado em vórtex por 3 minutos. Após agitação, o conteúdo foi deixado em repouso por 1 hora para separação das fases aquosa e hexadecano. A D.O. da fase aquosa foi então medida a 600 nm. A hidrofobicidade foi expressa como a porcentagem de aderência ao hexadecano, calculada como segue:  $100 \times (1 - \text{D.O. da fase aquosa} / \text{D.O. da suspensão celular inicial})$ . Três determinações foram realizadas para cada amostra. As células foram consideradas muito hidrofóbicas quando o resultado for maior que 60% e pouco hidrofóbicas quando os resultados forem inferiores a 10% (Bouchez-Naitali et al.1999).

#### *Determinação da carga iônica do biossurfactante*

A carga iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de difusão dupla em Agar modificada (MEYLHEUC et al., 2001). Duas fileiras regularmente espaçadas de poços foram feitas em ágar de baixa viscosidade (solução a 1 %). Os poços das fileiras inferiores foram preenchidos com a solução do surfactante isolado. Cada poço da fileira superior foi preenchido o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02 M, enquanto que a substância catiônica foi o cloreto de bário, na concentração de 0,05 M. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativas do caráter iônico do biossurfactante, foi monitorado durante 48 horas a temperatura ambiente.

## **Resultados e discussão**

#### *Cinéticas de crescimento de *C.sphaerica* e de produção do biossurfactante*

A Figura 1 mostra a cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante de *C. sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 9 % de resíduo de refinaria e 9% de milhocina.

A cinética de crescimento do microrganismo demonstrou um perfil diáuxico entre 12 e 20 horas e entre 24 e 36 horas de fermentação, refletindo-se na curva de pH. O início da fase exponencial de crescimento foi observado com 4hs de cultivo, prolongando-se até 60 horas de cultivo. Observou-se que a máxima produção de biomassa foi de 17g/L, após 120horas de cultivo. A maior produção de biossurfactante (9g/L) ocorreu na fase estacionária de crescimento após 144horas, enquanto que a tensão superficial do meio foi reduzida de 56 mN/m para 25 mN/m. Já o pH do meio aumentou nas primeiras 12 horas de crescimento exponencial, atingindo valores em torno de 7 e permanecendo inalterado até o fim do cultivo.

Os biossurfactantes produzidos de leveduras descritos na literatura nas décadas passadas têm demonstrado capacidade de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 35 mN/m (Kitamoto *et al.* 2002; Van Hame *et al.* 2003). Pesquisas mais recentes têm revelado valores compatíveis com os biossurfactantes bacterianos, como o resultado obtido nesse trabalho para o biossurfactante de *C. sphaerica*. Rufino *et al.* (2007) observaram que o biossurfactante produzido pela levedura *C. lipolytica* UCP 0988 cultivada em resíduo industrial como substrato reduziu a tensão superficial do meio para 26 mN/m nas 72 horas de cultivo, enquanto que Sarubbo *et al.* (2006), utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção do biopolímero de *C. glabrata*, observaram uma redução de tensão superficial para 31 mN/m após 144 horas de cultivo.

Coimbra *et al.* (2009), utilizando meio mineral suplementado com 2,5% de resíduo industrial e 2,5% de milhocina na produção de biossurfactante utilizando diferentes espécies de *Candida*, observaram a redução da tensão superficial para: *C. sphaerica*- 35 mN/m, *C. glabrata* - 34,12 mN/m, *C. tropicalis* - 43,08 mN/, *C. lipolytica* - 35 mN/m, *C. buinensis* - 27,63 e *C. guillermondii* - 30 mN/m.

Sobrinho *et al.* (2008), utilizando resíduos industriais para a produção de biossurfactante por *C. sphaerica*, observaram que a cinética de crescimento do microrganismo demonstrou um perfil diáuxico entre 12 e 24 horas, refletindo-se na curva de pH, e apresentou um rendimento de 4,5g/L em biossurfactante.

Sarubbo *et al.*(2007) observaram, para o biossurfactante produzido por *C. lipolytica* em meio contendo óleo de canola e glicose como substratos, que a concentração do biossurfactante começou a aumentar durante a fase exponencial de crescimento, atingindo seu máximo após 48 horas de fermentação. O rendimento foi de

8g/L. Com relação à tensão superficial, esta foi reduzida para valores em torno de 34mN/m.

Luna *et al.* (2008) observaram, para o biossurfactante produzido por *Candida glabrata* em meio contendo 50% água destilada e 50% água do mar suplementada com 4,0 % de resíduo de refinaria e 4,0 % de milho, também observou um perfil diaúxico, onde a fase estacionária foi atingida nas primeiras 48 horas de cultivo.

Estudos realizados por Cunha *et al.* (2004) utilizando gasolina como substrato para a produção de biossurfactante por *Serratia sp.* demonstraram que o pH do meio apresentou valores próximos a 6,0 ao final da fermentação. Os resultados obtidos sugerem que cada microrganismo apresenta um pH específico para o tipo de biossurfactante produzido.

Sarubbo *et al.* (1999, 2001) avaliaram a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *C. lipolytica* UFPEDA1055 e 1120 utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono, respectivamente. A produção de bioemulsificantes foi observada na fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária.

Rufino *et al.* (2008) observaram que o início da fase exponencial de crescimento de *C. lipolytica* UCP0988 foi observado com 4 horas de cultivo, prolongando-se até as 40 horas de cultivo e obteve um rendimento de 8g/L, enquanto que Sarubbo *et al.* (2006) observou que as cinéticas de crescimento da *C. glabrata* demonstraram um perfil de diauxia. A presença de glicose nos cultivos foi um fator determinante da acidez do meio já que, em sua presença, houve uma redução no pH, o qual atingiu valores estáveis em torno de 3,0, no início da fase estacionária de crescimento.

## **Propriedades do biossurfactante**

### *Estabilidade do biossurfactante relacionada à tensão superficial*

A redução da tensão superficial ou interfacial é considerada o principal parâmetro para detecção de um composto tensoativo em um determinado meio (Deleu and Paquot 2004).

Em adição à tensão superficial e/ou interfacial, a estabilidade de emulsões óleo/água também é muito utilizada como um indicador de atividade superficial, embora a habilidade de uma molécula em formar uma emulsão estável não esteja sempre

associada à redução da tensão superficial (Ilori, and Amund 2001; Urum and Pekdemir 2004; Youssef *et al.* 2004).

Fatores ambientais como pH, salinidade e temperatura também influenciam a atividade e a estabilidade de um biossurfactante. Conseqüentemente torna-se de fundamental importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos (Mulligan 2005).

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 144 horas de cultivo quanto a diferentes valores de pH, temperatura e concentrações crescentes de NaCl em função da tensão superficial do biopolímero .

Com relação à influência da temperatura sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante (Figura 2A), observou-se que a tensão superficial sofreu poucas alterações frente às temperaturas estudadas. Os resultados obtidos por Brown *et al* (1991) para o biossurfactante produzido pela bactéria designada como isolado 1165 demonstrou uma redução da tensão superficial no líquido metabólico livre de células quando submetido à temperatura entre 0 e 4°C, embora quando exposto a temperaturas elevadas (100 e 120 °C) tenha apresentado valores estáveis de tensões, entre 30,5 e 31,8mN/m. Markkar and Cameotra (2002) observaram a estabilidade da tensão superficial após a exposição do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* a temperatura de 100°C.

O biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduo industrial (RUFINO *et al.* 2007) e o biossurfactante produzido por *C. glabrata* (Luna 2006) demonstraram estabilidade térmica similar em relação à faixa de variação de temperatura testada.

Os testes realizados no líquido metabólico livre de células, com relação à variação do pH, demonstraram que o biossurfactante obtido não apresentou alterações significativas no valor da tensão superficial. Contudo, observou-se um aumento na tensão superficial nos pHs 10 e 12 (Figura 2B). De acordo com Kim *et al.* (2000), as tensões superficiais do biossurfactante de *Nocardia sp.* L-417 foram mantidas em todos os valores de pH testados (de 2 a 12), indicando que a variação do pH também não teve efeito significativo sobre a tensão superficial. Sobrinho *et al.* (2008) observaram que o biossurfactante de *C. sphaerica* manteve a capacidade de redução da tensão superficial frente a diferentes pHs, enquanto que Luna *et al.* (2009) observaram que o biossurfactante produzido por *C. glabrata* manteve-se estável nos diferentes pHs.

O biossurfactante de *Bacillus licheniformis* cultivado em resíduos agroindustriais, por outro lado, demonstrou estabilidade na faixa de pH entre 7,0 e 12,0 (Rammanl *et al.* 2005). A estabilidade da tensão superficial do líquido metabólico produzido por *Bacillus subtilis* foi determinada frente a diferentes pHs (3,0 a 11,0), observando-se, também, para essa bactéria, apenas pequenas variações, da ordem de  $4 \text{ mN m}^{-1}$  (BROWN *et al.*, 1985). A tensão superficial do líquido metabólico livre de células dos biossurfactantes isolados de espécies de *Bacillus* cultivados em melaço e soro de queijo também se manteve inalterada na mesma faixa de pH estudada nesse trabalho (Joshi *et al.* 2007).

A tensão superficial no líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante mostrou-se estável, independente da concentração de sal adicionada (Figura 2C). Estudos realizados por Desai and Banat (1997) demonstraram que concentrações acima de 2% de NaCl são suficientes para inativar o surfactante sintético.

Sobrinho *et al.* (2008) observaram que o biossurfactante de *C. sphaerica* manteve a capacidade de redução da tensão superficial até a concentração até 10 % de NaCl.

Pesquisas recentes sobre a produção de biossurfactantes por *C. lipolytica* (Sarubbo *et al.* 2007; Rufino 2006) e por *C. glabrata* (Sarubbo *et al.* 2006) e *C. sphaerica* (Sobrinho *et al.* 2008) demonstraram a estabilidade dos agentes tensoativos na presença de NaCl.

#### *Estabilidade do biossurfactante relacionada à habilidade de emulsificação*

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns a maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais: tolerância a temperatura, pH e força iônica.

A estabilidade do biossurfactante também foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 144 horas de cultivo em função do índice de emulsificação do biopolímero. A variação da temperatura não exerceu grande influência na capacidade de emulsificação dos substratos emulsificados pelo líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *C. sphaerica*, destacando-se a manutenção de praticamente 100 % da atividade de emulsificação do óleo de motor a 70, 100 e 120 °C (Figura 3A).

O biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduo industrial (Rufino *et al.* 2007) e o biossurfactante lipopeptídico de *Bacillus subtilis* C9 cultivado em glicose (Kim *et al.* 1997) demonstraram estabilidade térmica similar em relação à faixa de variação de temperatura testada, embora o biossurfactante de *C. lipolytica* tenha perdido significativa capacidade de emulsificação a 100°C. Cirigliano and Carman (1984) reportaram que o emulsificante de *Candida lipolytica* permaneceu estável a 70 °C por 1 hora, perdendo 60 % da atividade a 100°C. O bioemulsificante de *Penicillium* sp. também demonstrou estabilidade a 93°C (Luna-Velasco *et al.* 2007). Já o biossurfactante de *Bacillus pumilus* espécie 28-11, embora tenha formado emulsões muito estáveis com óleo bruto, teve a estabilidade diminuída pelo calor (Calvo *et al.* 2004). A variação da temperatura também não exerceu grande influência na capacidade de emulsificação do líquido metabólico livre de células do biossurfactante de *C. glabrata* UCP1002 (Sarubbo *et al.* 2007).

O bioemulsificante de *Penicillium* sp. também demonstrou estabilidade a 93 °C (Luna-Velasco *et al.* 2007). Já o biossurfactante de *Bacillus pumilus* espécie 28-11, embora tenha formado emulsões muito estáveis com óleo bruto, teve a estabilidade diminuída pelo calor (Calvo *et al.* 2004).

Como mostra a figura 3B, observou-se que o surfactante emulsificou bem os substratos testados independente da concentração de NaCl a qual foi submetido (Desai and Banat 1997).

Sobrinho *et al.* (2008) observaram que a atividade de emulsificação do óleo de motor permaneceu praticamente inalterada ao longo da adição do sal. A estabilidade demonstrada pelo biossurfactante de *C. sphaerica* sob condições elevadas de salinidade sugerem a aplicação em ambientes marinhos e em indústrias relacionadas à emulsificação. O emulsificante produzido por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 cultivada em n-hexadecano não resistiu a adição de NaCl até 8 % (Zinjarde *et al.* 1997), enquanto que o emulsificante de *Candida tropicalis* foi capaz de tolerar 5 % de NaCl, embora tenha perdido 20% de sua atividade quando submetido à 10 % do sal (Singh and Desai 1989). Pesquisas recentes sobre a produção de biossurfactantes por *C. lipolytica* (Sarubbo *et al.* 2007; Rufino *et al.* 2007) e por *C. glabrata* (Sarubbo *et al.* 2006) demonstraram a estabilidade dos agentes tensoativos na presença de NaCl. Resultados promissores relacionados à estabilidade sob condições salinas também

têm sido demonstrados para outros surfactantes produzidos por bactérias (Ilori *et al.* 2005; Kim *et al.* 2000; Luna-Velasco *et al.* 2007; Navon-Venezia *et al.* 1995).

Sarubbo *et al.* (2006) observaram que a adição de 10% de NaCl ao líquido metabólico livre de células do biossurfactante de *Candida glabrata* UCP1002 provocou redução de aproximadamente 20% na atividade de hexadecano, mostrando tolerância da emulsão a elevadas concentrações de sal. Também foram observadas reduções na atividade de emulsificação do surfactante de *Candida lipolytica* cultivada em n- hexadecano e em culturas mistas suplementadas com melão em presença de NaCl (Ghurye *et al.* 1994).

Testes também foram realizados para variação do pH (2,4,6,8,10 e 12). Observou-se que o maior índice de emulsificação foi obtido com óleo motor, de 100%, permanecendo inalterado frente aos pHs (Figura 3C). O emulsificante de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 cultivada em hexadecano também permaneceu estável e ativo em uma ampla faixa de pH (2,0-10,0), embora uma perda significativa tenha sido observada acima do pH 10,0 (Zinjarde *et al.* 1997). A eficiência do biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em óleo de canola e glicose, se limitou à faixa ácida-neutra de pH, embora um aumento acentuado no índice de emulsificação tenha ocorrido no pH 12,0 (Sarubbo *et al.* 2007). O biossurfactante de *Bacillus licheniformis* cultivado em resíduos agroindustriais, por outro lado, demonstrou estabilidade na faixa de pH entre 7,0 e 12,0 (Rammani *et al.* 2005). A estabilidade da tensão superficial do líquido metabólico produzido por *Bacillus subtilis* foi determinada frente a diferentes pHs (3,0 a 11,0), observando-se, também, para essa bactéria, apenas pequenas variações, da ordem de 4 mN/m (Brown *et al.* 1985). A tensão superficial do líquido metabólico livre de células dos biossurfactantes isolados de espécies de *Bacillus* cultivados em melão e soro de queijo também se manteve inalterada na mesma faixa de pH estudada nesse trabalho (Joshi *et al.* 2007).

Sarubbo *et al.* (2006) observaram 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 a emulsificação do óleo de algodão. A atividade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* também foi estável a diferentes valores de pH (Makkar and Cameotra 1998), embora a efetividade do liposão de *Candida lipolytica* como emulsificante tenha sido limitada à faixa de pH ácido (Cirigliano and Carman 1985).

### *Isolamento do biossurfactante*

O rendimento do biossurfactante produzido em meio de baixo custo por *C. sphaerica* foi de 9g/L ao final das 144 horas de cultivo. Sarubbo *et al.* (2007) obteve um rendimento de 8g/L para o biossurfactante produzido por *C. lipolytica* utilizando óleo de canola e glicose como substratos. Estudos realizados por Sobrinho *et al.* (2008) utilizando dois resíduos industriais como fonte de carbono demonstraram um rendimento de 4,5 g/L de biossurfactante produzido por *C. sphaerica*. Rufino *et al.* (2007) obtiveram rendimentos de 8 g/L para o biossurfactante de *C. lipolytica* utilizando extrato de levedura e resíduo industrial como substratos.

### *Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante*

Outra importante propriedade dos biossurfactantes potentes é a habilidade de atuarem na formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas (Hua *et al.* 2003; Amaral *et al.* 2006). A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação das micelas. A Concentração Micelar Crítica (CMC) é a mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo.

O biossurfactante de *C. sphaerica* exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão superficial da água foi reduzida de 70 mN/m para 25mN/m com o aumento da concentração do biossurfactante até 0,025% (Figura 8). A partir desse ponto, o aumento da concentração da solução do biossurfactante não provocou maiores reduções na tensão superficial da água, indicando que a CMC havia sido atingida nessa concentração. O biossurfactante de *C. sphaerica* demonstrou maior capacidade de reduzir a tensão do que os surfactantes de *C. lipolytica* (32 mN/m) (Rufino *et al.* 2007), de *C. glabrata* (31 mN/m) (Sarubbo *et al.* 2006), de *C. antarctica* (35 mN/m) (ADAMCZAC, BEDNARSKI, 2000) e de *Yarrowia lipolytica* (50 mN/m) (Gallert *et al.* 2002). O biossurfactante produzido nas condições estudadas nesse trabalho também demonstrou uma CMC muito inferior do que a CMC de outros surfactantes de leveduras descritos na literatura, considerando os valores de 2,5 % encontrados para os biossurfactantes de *C. lipolytica* (Sarubbo *et al.* 2007) e *C. glabrata* (Luna *et al.* 2007) e valores de 1 % para o biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduo de refinaria (Rufino *et al.* 2007) e valores de 0,08 % para *C. sphaerica* (Sobrinho *et al.* 2008).

### *Composição química do biossurfactante*

A biossíntese de biossurfactantes por um grande variedade de bactérias e leveduras tem sido reportada (Daniel *et al.* 1998; Lang *et al.* 1999) envolvendo geralmente raminolípídeos e lipídios sulfurosos (Zhou and Kosaric 1995). Os biossurfactantes produzidos diferem bastante entre as diferentes espécies. Relatos sobre a produção de glicolípídeos (Desai and Desai 1993; Garcia-Ochoas and Casas, 1999; Sheperd *et al.* 1995), complexos carboidratos-proteínas (Cirigliano and Carman, 1985), ácidos graxos de cadeia longa (Kapelli and Fiechter 1978) e complexos proteínas-carboidratos-lipídeos (Sarubbo *et al.* 1999; 2001, 2006; 2007; Rufino *et al.* 2007; Zinjarde *et al.* 1997), produzidos a partir de substratos solúveis ou insolúveis ou da combinação de ambos, têm sido descritos.

A análise preliminar do biossurfactante isolado a partir do cultivo de *C. sphaerica* em resíduo da indústria de óleo de soja e milhocina como substratos indicou a presença de 70% de lipídios e 15% de carboidratos. Liposan, um emulsificante produzido por *C. lipolytica* é composto por 93% de carboidratos e 7% de proteínas (Cirigliano and Carman 1985). Outros polímeros emulsificantes contendo proteínas, carboidratos e lipídios também foram produzidos por *C. lipolytica* quando cultivada em óleo vegetal de babaçu e glicose como fontes de carbono (Sarubbo *et al.* 1999).

Sobrinho *et al.* (2008) observaram que o biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* indicou a presença de 75% de lipídeos e 25 % de carboidratos, revelando a natureza glicolípídica.

Gusmão *et al.*(2007) observaram que o biossurfactante produzido por *Candida glabrata* utilizando resíduo industrial apresentou 34% de proteínas, 18% de lipídeos e 48% de carboidratos.

Rufino *et al.*(2008) observaram que o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* utilizando resíduo da industria de óleo de soja e ácido glutâmico apresentou 50% de proteínas, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos em sua constituição.

### *Hidrofobicidade celular e Tensão interfacial*

As interações hidrofóbicas exercem um papel importante na aderência de microrganismos às superfícies. Em particular, a natureza hidrofóbica das superfícies bacterianas tem sido citada com fator de crescimento das células em substratos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos. Neste caso, o contato da célula com os

compostos hidrofóbicos se torna um requerimento, uma vez que o primeiro passo na degradação de hidrocarbonetos aromáticos é a introdução de oxigênio nas moléculas através da oxigenases associadas à célula (Vasilena Tonkova *et al.* 2008).

A transferência e utilização de substratos insolúveis requerem adaptações fisiológicas específicas e muitos microrganismos têm desenvolvido estratégias diferentes de interação com estes compostos hidrofóbicos. Dois tipos gerais de interação célula-hidrocarboneto, dependendo da relação entre o estado e o tamanho da gota de hidrocarboneto com o tamanho da célula microbiana, têm sido postulados: adesão específica das células a grandes gotas de óleo e pseudosolubilização envolvendo a assimilação celular das pequenas gotas do hidrocarboneto emulsificadas.

Considera-se que a existência de uma alta hidrofobicidade celular permita a aderência da célula à fase oleosa insolúvel, o que pode ser observado através de um alto valor de tensão interfacial do líquido metabólico, provando que não há produção de biossurfactante. Por outro lado, os pré-requisitos para o transporte mediado por um biossurfactante são baixa tensão interfacial e baixa hidrofobicidade celular; esta última garante a não aderência da célula a interfaces hidrofóbicas (Bouchez-Naitali *et al.* 1999).

Os mecanismos envolvidos na entrada de substratos hidrofóbicos na célula microbiana têm sido extensivamente discutidos nas últimas décadas. Normalmente, a produção efetiva de biossurfactantes é vista como um critério óbvio de existência de um mediador necessário para a transferência de um hidrocarboneto, ou seja, a célula só poderia englobar o substrato insolúvel pela ação de um biossurfactante (Bouchez-Naitali *et al.* 1999), embora inúmeras pesquisas descrevam a produção de biossurfactantes por microrganismos cultivados em substratos solúveis (Sarubbo *et al.* 2001; Sarubbo *et al.* 2007).

Nesse sentido, determinações foram realizadas no líquido metabólico obtido após 144 horas de cultivo da levedura para diagnosticar os modos de ingestão dos substratos, que envolveram a hidrofobicidade celular e as tensões superficial e interfacial, as quais forneceram informações básicas sobre a transferência dos substratos mediada pelo biossurfactante.

*Candida sphaerica* cultivada em meio contendo resíduos industriais apresentou elevada hidrofobicidade, de 60%, e valores baixos de tensão superficial (25 mN/m) e

tensão interfacial (12,5 mN/m), indicando a possibilidade de utilização de dois mecanismos de transferência para os substratos, ou seja, ingestão interfacial direta e transferência mediada pelo biossurfactante, seja por solubilização (transferência micelar) ou emulsificação dos substratos.

Bouchez-Natali *et al.* (1999) estes pesquisadores também observaram baixas tensões superficial e interfacial, mas alta hidrofobicidade celular, quando culturas de *Pseudomonas fluorescens* Es1 foram cultivadas em n-hexadecano, enquanto que Vasileva-Tonkova e Gesheva (2005) observaram valores relativamente altos de hidrofobicidade celular e alta atividade de emulsificação para o isolado *Arthrobacter* sp. HW8, sugerindo que esta espécie possa empregar ambos os mecanismos, ou seja, transferência interfacial e aumento da emulsificação do alceno via biossurfactante.

Coimbra *et al.*(2009) observaram que as leveduras *Candida sphaerica*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. lipolytica*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* apresentaram elevada hidrofobicidade e valores altos e intermediários de tensão superficial e tensão interfacial quando cultivadas em substratos solúvel (glicose) e insolúvel ( óleo de Soja e glicose), concluindo que a hidrofobicidade pode variar de acordo com o meio de crescimento celular. Já Vasileva-Tonkova *et al.*(2008) observaram que a hidrofobicidade da superfície celular da *Nocardioides* sp. A-8 foi alta quando a bactéria foi cultivada em parafina (53%) ou no substrato solúvel (72,4%).

#### *Determinação da carga iônica*

O biossurfactante Lunasan produzido por *Candida sphaerica* cultivado em resíduos industriais apresentou caráter aniônico. Outros biossurfactantes produzidos por espécies de *Candida* também apresentaram caráter aniônico quando submetidos ao mesmo teste (Rufino *et al.* 2008; Sobrinho *et al.* 2008).

#### **Conclusões**

O biossurfactante denominado de Lunasan produzido pela *Candida sphaerica* apresenta baixa CMC, tensão superficial e atividade de emulsificação estável frente a altas temperaturas, diferentes pHs e condições salinas elevadas, demonstrando potencial para aplicações industriais e ambientais, em especial na recuperação de óleos, na limpeza de reservatórios, como também na biorremediação de solos contaminados com poluentes hidrofóbicos, setores da indústria petroquímica que

requerem produtos baratos, eficientes e estáveis frente a condições ambientais extremas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem às agências financiadoras FACEPE, CAPES, CNPq, FINEP, PRONEX e a UNICAP, pelo uso de suas instalações.

## Referências

Akhtar, M., Lentz, M.J., Blanchette, R.A., Kirk, T.K. (1997) Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. *TAPPI J.* **80**, 161-164.

Amaral, P.F.F. Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z. Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P. (2006). Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* **41**, 1894-1898.

Adamczak, M., Bednarski, W. (2000) Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters* **22**, 313-316.

Brandão, L.V.C. Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Candida*, isoladas de solo de mata e solo poluído com chumbo. tese (doutorado) UNESP, 2001

Bredholdt, H., Josefen, K., Vatland, A., Bruhelm, P., Eimhjellen, K. (1998) Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. *Canadian Journal of Microbiology* **44**, 330-340.

Bouchez-Naitali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J., Van-Decastole, J.P. (1999) Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. appl. Microbial* **86**, 421-428.

Brown, M. J., Foster, M., Moses, V., Robinson, J. P., Shales, S. W., Springham, D.G.(1985) – In: EUROPEAN MEETING ON IMPROVED OIL RECOVERY, 3th., Proceedings Rome.

Calvo, C., Toledo, F.L., González-López, J. (2004) Surfactant activity activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology* **109**, 255-262.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-Lopéz, J. (2009) Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment* **407**, 3634-3640.

Cardinal, E.V., Hedrick, L.R. (1947) Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biol. Chem* 609-612.

Cameotra, S.S., Makkar, R. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 520-529.

Cirigliano, M.C., Carman, G.M. (1985) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 747-750.

Cooper, D.G., Goldenberg, B.G.(1987) Surface active agents from two *Bacillus species*. *Applied Enviromental Microbiology*. 53, 224-229.

Cortis, A., Ghezzehei, T. A. (2007) On the transport of emulsions in porous media. *Journal of Colloid and Interface Science* 313, 1-4.

Coimbra, C.D., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A. (2009) Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology* **58**, 245-249.

Cunha, C.D., Rosário, M., Rosado, A.S., Leite, S.G.F. (2004) *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry* **30**, 2277-2282.

Daniel, H.J., Ress, M., Syldatk, 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**, 153-1156.

Desai, J.D., Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbial Molecular Reviews* **61**, 47-64.

Desai, J.D., Desai, A.J.(1993) Production of Biosurfactants. In: Kosaric N (ed). **Biosurfactants**: production, properties, applications. Surfactant Science Séries. Marcel Dekker Inc., New York, **48**, 65-97.

Deleu, M., Paquot, M. (2004) From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Computers Rendus Chimie*. **7**, 641-646.

Garcia-Ochoa, F., Casas, J.A.(1999) Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**, 613-621.

Gautam, K.K., Tyagi, V.K. (2006) Microbial Surfactants: A review. *Journal of Oleo Science* **55**, 155-166.

Gallert, C., Winter, J. (2002) Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Zeitschrift fur Naturforschung* **89**, 483-496.

Ghurye, G. L., Vipulananda, C., Wilson, R.C.A. (1994) Practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*.**44**, 661 – 666.

Gusmão, C.A.B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A.(2005) Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* a partir de resíduo industrial como substrato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 24, **Anais**.Santos: SBM.

Hanson, R.S., Phillips, J.A., Gherhardt, P. (1981) Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC. 328-364.

Hua, Z., Chen, J., Lun, S., Wang, X. (2003) Influence of biosurfactants produced by on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research*. **37**, 4143 – 4150.

Ilori, M.O., Amobi, C.J., Odocha, A.C.(2005) Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere* . **61**, 985-992.

Ilori, M.O., Amund, O.O. (2001) Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. *Z. Naturforsch* **56**, 547-552, 2001.

Kappeli, O.; Muller, M.; Fiechter, A. (1978) Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *Journal of Bacteriology* **133**, 952-958.

Kim S.H., Lim, E.J., Lee, S.O., Lee, J.D., Lee, T. H. (2000) Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L - 417. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **31**, 249-253.

Kim, H-S., Yoon, B-D., Lee, C-H., Suh, H-H., Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y.(1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation Bioengineering* **84**, 41-46.

Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara T. (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **94**,187-201.

Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, Mi. (2001) Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. **46**, 109-120.

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S.; Yadav, S., Nerurkar, A.; Desai, A.J.(2007) Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Tecnology*. IN PRESS.

LUNA, J.M- Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas de biossurfactante...

Lang, S., Wullbrandt, D. (1999) Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial surfactants *Applied Microbiology Biotechnology* **51**, 21-32.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.

Luna, J.M. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata***. Recife. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 65f.

Luna J.M., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M.(2009) A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **52**, 785-793.

Luna, J. M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M.(2008) Determinação da estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*. **In: XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental.**

Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M.(2008) Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. *Exacta* **6**, 209-215.

Luna-Velasco, M.A., Esparza-García, F., Cañizares-Villanueva, R.O., Rodrigues-Vázquez, R. (2007) Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochemistry* **42**, 310-314.

Manocha, M.S., San-Blas, G., Centeno, S. (1980). Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. *Journal of General Microbiology* **117**, 147-154.

Makkar, R.S, Cameotra, S.S (1998) Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**, 48-52.

Meylheuc, T., Van Oss, C.J., Bellon-Fontaine, M.N. (2001) Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 822-832.

Maneerat, S. (2005) Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin J. Sci Technol* **27**, 675-683.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P. (2008) Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science* **94**, 736-747.

Mulligan, C. N. (2005) Environmental applications of biosurfactants. *Environmental Pollution* **133**, 183-198.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmelli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E. (1995) Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3240-3244.

Rammani, P., Kumar, S.S., Gupta, R. (2005) Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. *Process Biochemistry* **40**, 3352-3359.

Rufino, R.D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica***. Recife, 2006. Dissertação (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006, 95f.

Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Campos-Takaki G.M.(2008) Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 729-734.

Sarubbo, LA, Porto, A.L.F, Campos-Takaki, GM. (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.I.C, Silva, M.P.C, Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M. (2001) Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **95**, 59-67.

Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B., Campos-Takaki, G.M. (2007) Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology* **54**, 68-73.

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. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**, 400 – 406.

Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P. (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. *Application aspects*. *Biotechnol* **25**, 99-121.

Singh, M., Desai, J.D. (1989) Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Indian Journal of Experimental Biology* **27**, 224-226.

Shepherd, R., Rockey, J., Shutherland, I.W., Roller, S. (1995) Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology* **40**, 207-217.

Soon, E.L., Salleh, A.B., Basri, M., Rahman, R.N., Kamaruddin, K. (2004) Response surface methodological study on lipase-catalyze synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry* **39**, 1511-1518.

Sobrinho, H.B.S. Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Campos-Takaki, G.M.; Leite, L.F.C., Sarubbo, L.A. (2008) Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sp aerica* UCP0995. *Process Biochemistry* **43**, 912-917.

Thompson, D.N., Fox, S.L., Bala, G.A (2000) Biosurfactants from potato process effluents. *Appl. Biochem. Biotechnol* **84**, 917-930.

Urum, K., Pekdemir, T., Copur, M. (2004) Surtactants treatment of oil contaminated soils. *Journal of Colloid and interface Sciencw* 456-464.

Vasilena-Tonkova, E., Galabova, D., Staimenova, E., Lachev, Z.. (2008) Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane Uptake. *Microbial Res* **163**, 481-486.

Vasilena-Tonkova, E., Gesheva, V. (2005) Glycolipides produced by *Antartic nocardioídes sp.* During growth on n- paraffin. *Process Biochem* **40**, 2387-2391.

Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 503-549.

Youssef, N. H., Ducan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., Mcinerney, M. J.(2004) Comparision of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 339-347.

Zai Rate, G., Nader-Macias, M.E. (2006) Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol*, **43**, 174 –180.

Zinjarde, S.A., Chinnathambi, S.A., Lachke, A.H.A., Pant, A.(1997) Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoeletctric focusing unit. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 117-121.

Zhou, Q.H., N. Kosaric. (1995) Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *Journal of American Oil and Chemistry Society* **72**, 67-71.

Figura 1- Curvas de crescimento, pH, tensão superficial e rendimento em biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 9,0 % de resíduo de refinaria e 9,0 % de milhocina

Figura 2- Influência da temperatura (A), da variação do pH (B) e (C) da adição de NaCl na redução da tensão superficial do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* cultivada em 9,0 % de resíduo de refinaria e 9,0% de milhocina

Figura 3- Influência da temperatura (A), adição de NaCl (B) e do pH(C) na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* cultivada em 9,0 % de resíduo de refinaria e 9,0% de milhocina

Figura 4- Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* cultivada em água destilada suplementada com 9,0 % de resíduo e 9,0 % de milhocina

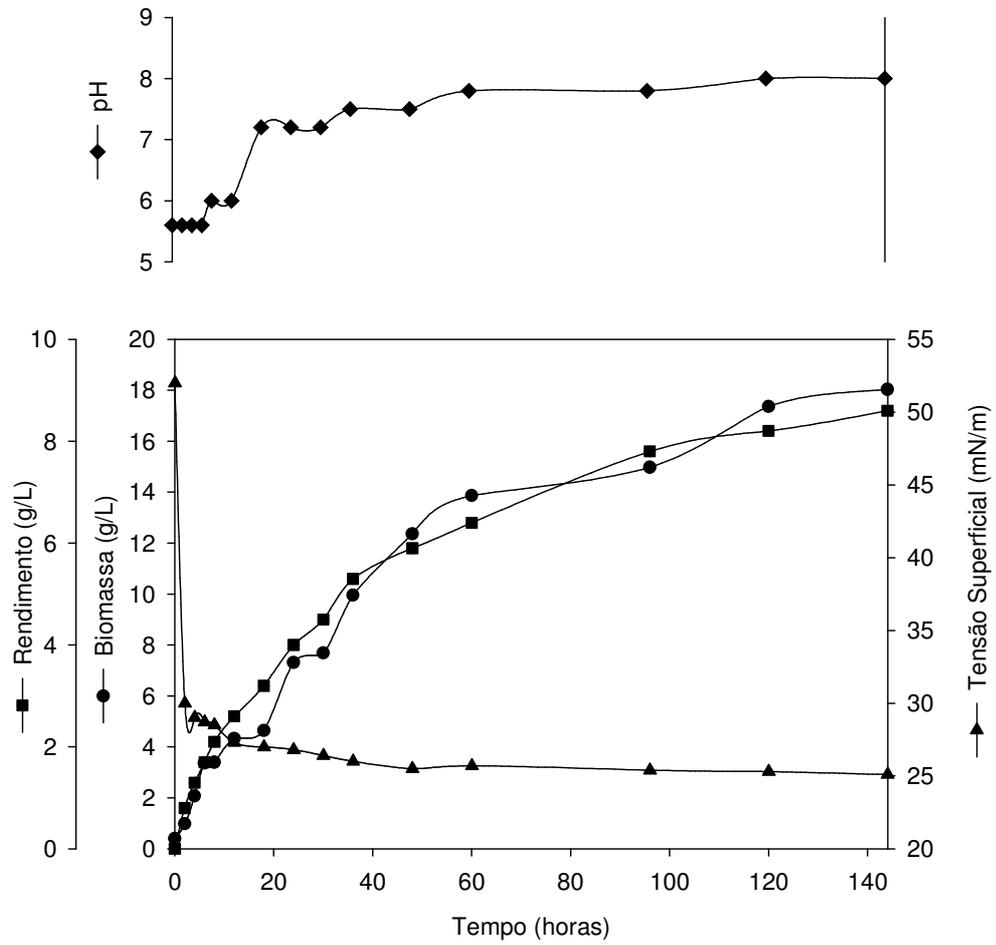
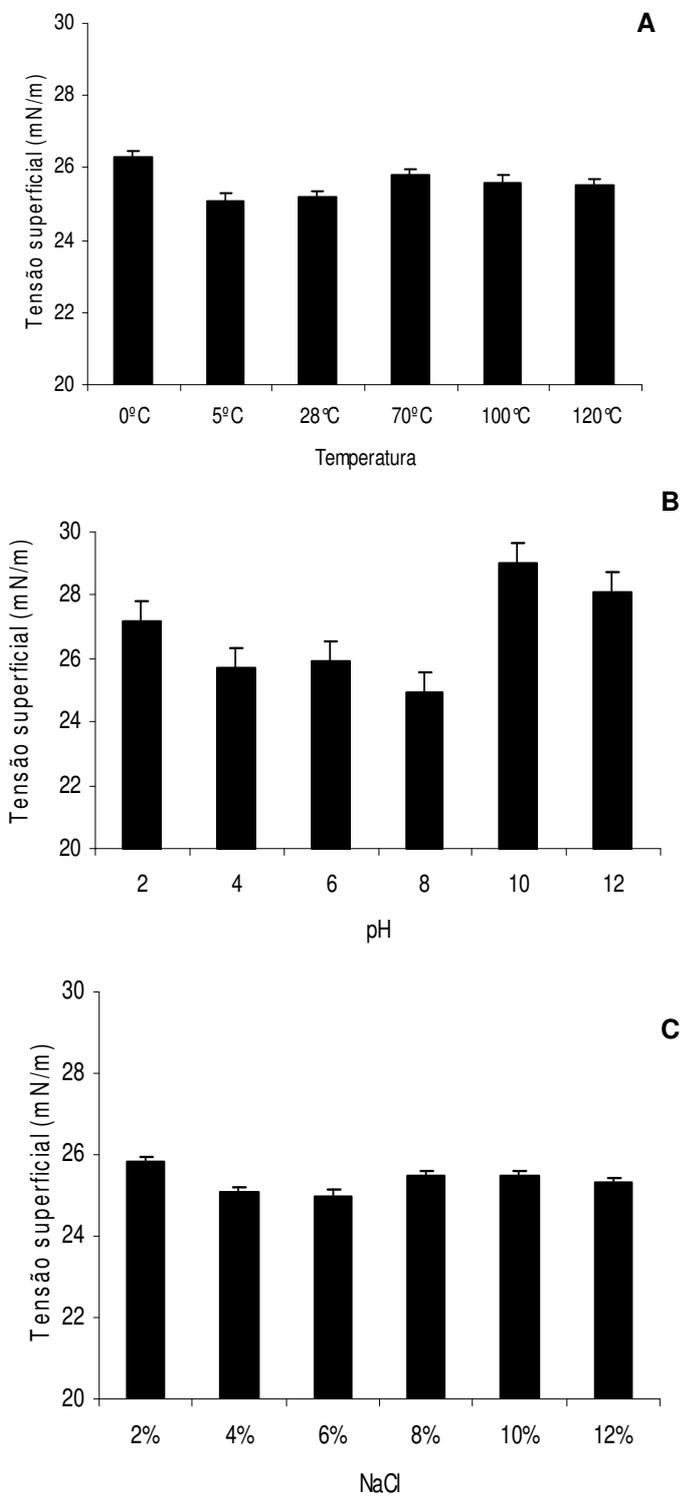


Figura 1



**Figura 2**

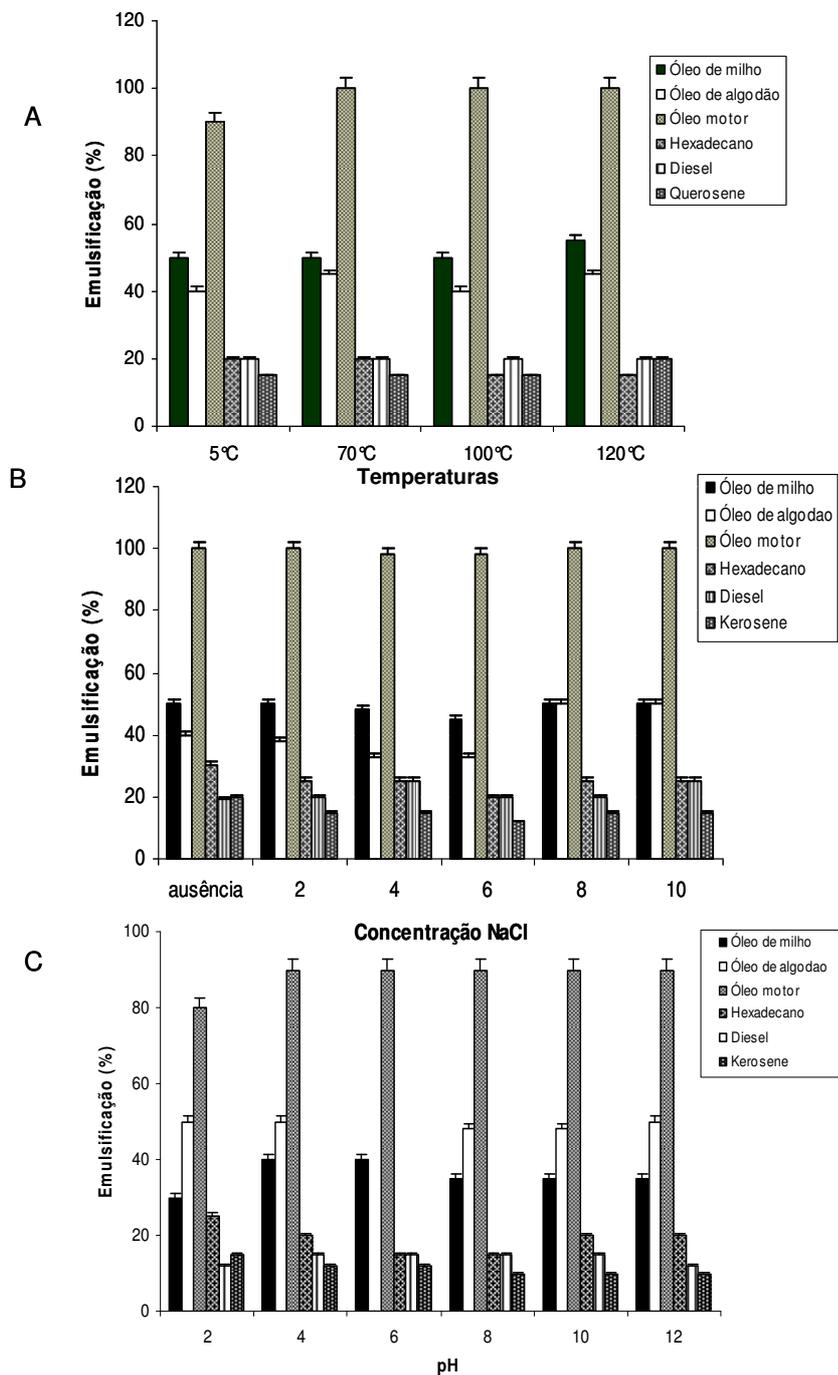
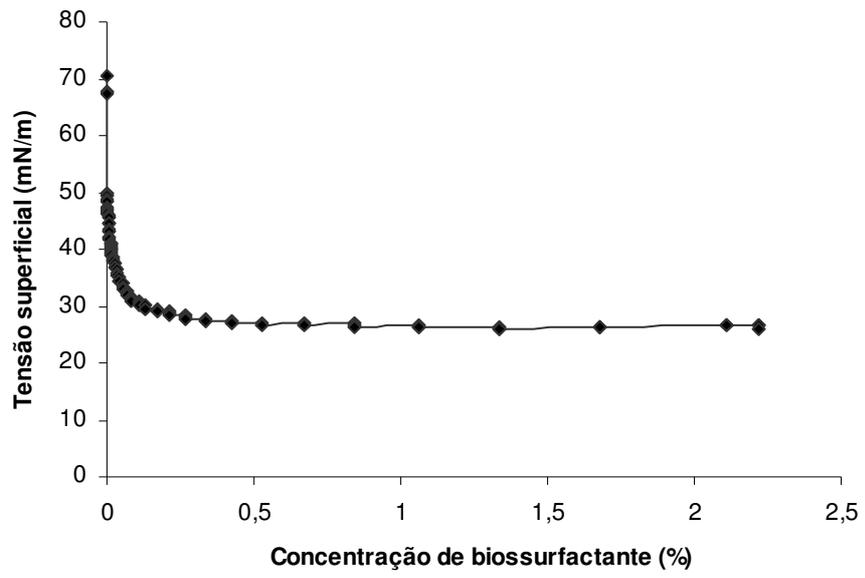


Figura 3



*Figura 4*

**Artigo 3**

**Manuscrito a ser submetido ao Periódico Internacional:Current Microbiology**

Fator de impacto: 1,03

**Atividade antimicrobiana e Antiadesiva do biossurfactante Lunasan  
produzido por *Candida sphaerica* UCP 0995**

Juliana M. Luna<sup>a,b</sup>, Leonie A. Sarubbo<sup>b,c</sup>, Lígia Raquel M. Rodrigues<sup>d</sup>, José Antonio C.  
Teixeira<sup>d</sup>, Galba M. Campos-Takaki<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50.670-420, Recife-Pernambuco, Brasil*

<sup>b</sup>*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE, Brasil*

<sup>c</sup>*Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife- PE, Brasil*

<sup>d</sup>*Centro de Engenharia biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal*

\*Autores para correspondência: Tel.: +55-81-21194044, Fax: +55-81-21194043, E-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br); [leonie@unicap.br](mailto:leonie@unicap.br)

## RESUMO

O biossurfactante foi produzido em meio de baixo custo formulado com água destilada suplementada com 9% do resíduo de refinaria de óleo de soja e 9% de milhocina durante 144 horas a 28 °C sob agitação de 150 rpm. O líquido metabólico livre de células obtido ao fim do cultivo foi submetido à extração, sendo o biossurfactante isolado em metanol com um rendimento de 9 g/L. A concentração micelar crítica do biossurfactante foi de 0,025%, sendo a tensão superficial nesse ponto de 25 mN/m. Após o isolamento, o biossurfactante foi submetido a testes de atividade antimicrobiana e anti-adesiva, avaliados para várias concentrações do biossurfactante (0,625 - 10 mg ml<sup>-1</sup>) e comparados com uma variedade de linhagens de bactérias e leveduras. O biossurfactante isolado apresentou os maiores percentuais de atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Streptococcus oralis* (68%), *Candida albicans* (57%) e *Staphylococcus epidermidis* (57,6%) na concentração mais alta testada. O biossurfactante demonstrou grande potencial anti-adesivo, sendo os maiores percentuais de adesão obtidos para os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *S. agalactiae*, *Streptococcus sanguis*<sup>12</sup>, *Candida tropicalis*, *Echerichia coli*, e *Streptococcus salivarius*, com percentuais de inibição de 80 a 92%. Quase 100% de inibição da aderência ocorreu a altas concentrações (10 mg ml<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos indicam o potencial médico do biossurfactante Lunasan de *C. sphaerica*.

Palavras-chave: biossurfactante, levedura, *Candida*, atividade anti-adesiva, atividade antimicrobiana.

## **Introdução**

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais [17]. Paralelamente, a Biotecnologia permitiu ampliar os limites de aplicação dos aditivos sintéticos, desenvolvendo novos produtos baseados na capacidade sintética dos microrganismos. Estas perspectivas, relacionadas aos produtos de elevado interesse industrial, têm conduzido a investigação e o desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias na produção de agentes surfactantes microbiológicos [15].

Os surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfipáticas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam preferencialmente na interface entre fases fluidas que possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica [14]. Estas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões, possibilitando inúmeras aplicações biológicas (terapêuticas) como atividade biológica protetora, antibióticos, atividade fungicida, inseticida e antiviral e inibidores de enzimas [3].

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser aplicados em uma variedade de processos industriais; entretanto, ainda não são amplamente utilizados, devido ao seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto [28]

Alguns biossurfactantes, além de suas propriedades detergentes, podem apresentar em concentração baixa, forte ação desestabilizante de membranas e assim,

conferir propriedade antimicrobiana [4]. O interesse inicial pelos biossurfactantes foi originado pela propriedade antimicrobiana. Os dois biossurfactantes mais bem estudados, ramnolípídeo e surfactina, foram primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968, respectivamente, por estas características [16].

Os microrganismos empregam um mecanismo de sobrevivência pelo processo de adesão a superfícies e de formação de biofilmes. Eles se aderem à superfície através de complexos polissacarídicos, formando uma comunidade microbiana chamada biofilme, a qual protege seus habitantes de desidratação, de predadores, biocidas e outras condições ambientais extremas. A adesão de microrganismos patogênicos a diferentes células é o primeiro passo em direção à infecção. A colonização de superfícies pode ser benéfica ou destrutiva. Enquanto que a fixação do oxigênio e a biorremediação de resíduos aquosos constituem funções benéficas dos biofilmes microbianos, a obstrução da passagem do fluxo em condutos ou filtros e a corrosão constituem problemas de ordem econômica para as indústrias de alimentos, marinhas, de petróleo e de manufaturados. Bactérias patogênicas empregam a formação de biofilme como mecanismo de contra-ataque do mecanismo de defesa de hospedeiros ou de drogas. Estando protegidas no biofilme, as bactérias patogênicas podem produzir várias substâncias tóxicas, as quais atuam contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Várias doenças, como fibrose cística, por exemplo, são causadas por biofilmes. Contudo, a modificação de uma superfície por um composto, leva a uma alteração permanente da superfície de modo que a afinidade da bactéria pela superfície condicionada seja reduzida ou aumentada quando comparada à superfície nativa [5].

Neste trabalho foram investigadas as propriedades biológicas relacionadas as atividade antimicrobiana e anti-adesiva do biossurfactante Lunasan produzido por *C. sphaerica* em meio de baixo custo.

## **Materiais e Métodos**

### *Microorganismo*

*Candida sphaerica* (UCP 0995) foi utilizada como microrganismo produtor de biossurfactante, isolada do solo contaminado por metais do município de Belo Jardim (BRANDÃO 2001) mantida em meio YMA (Yeast Mold Ágar) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

### *Produção do biossurfactante*

A produção do biossurfactante Lunasan foi realizada no meio à base de água destilada contendo 9% de resíduo da refinaria de óleo de soja e 9% de milhocina. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 27 °C.

### *Isolamento do biossurfactante*

Após 144 horas de cultivo da *Candida sphaerica* na condição selecionada, o líquido metabólico livre de células foi submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com HCl 6M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso durante 24 horas a -15°C, as amostras foram centrifugadas à 4000g por 30 minutos, lavadas com metanol gelado por duas vezes e secas em estufa a 37°C por 24-48 h, até secagem, e mantidas em dessecador até peso constante, sendo o rendimento em produto isolado calculado em g/L. Todas as análises foram feitas em triplicata.

### *Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)*

A tensão superficial e a CMC foram medidas de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina et al. [12], em tensiômetro automático (Modelo Sigma 70, KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de NUOY. A CMC foi determinada, partindo-se de uma solução de concentração conhecida do biossurfactante isolado.

### *Determinação da Atividade Antimicrobiana do biossurfactante*

A atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* foi testada contra os seguintes microrganismos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* 72, *Lactobacillus reuteri* 104R, *Lactobacillus reuteri* ML1, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* 12, *Streptococcus mutans* NS, *Streptococcus mutans* HG, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus oralis* J22, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*. O biossurfactante isolado foi dissolvido em PBS, para concentrações no intervalo de 0,625 - 10 mg ml<sup>-1</sup>. Em placas de 96 poços adicionou-se, assepticamente, 125 µl dos meios de cultura específico para cada microrganismo, em todos os poços. Na primeira coluna das placas foi colocado 125 µl dos extratos do biossurfactante dissolvido em PBS, e em seguida transferiu-se 125 µl dos poços da primeira coluna para a coluna seguinte, e assim sucessivamente. Todos os poços foram inoculados com 2,0 µl de uma diluição 1:2 de uma cultura crescida *overnight*. A placa foi incubada durante 24 a 37°C. Após esse período determinou-se a turbidez do conteúdo dos poços a 600nm [20].

### *Determinação da Atividade Anti - Adesiva do biossurfactante*

A atividade anti-adesiva do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* foi testada contra os seguintes microrganismos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* 72, *Lactobacillus reuteri* 104R, *Lactobacillus reuteri* ML1, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* 12, *Streptococcus mutans* NS, *Streptococcus mutans* HG, *Streptococcus oralis* J22, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Echerichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. O biossurfactante isolado foi dissolvido em PBS, para concentrações no intervalo de 0,625 - 10 mg ml<sup>-1</sup>. 200 µl das soluções do biossurfactante foram colocada nos poços de uma placa estéril de 96 poços para cultura de tecidos, incubada durante 18 h, a 4°C e 200 µl de suspensões lavadas dos microrganismos citados acima foram incubados nos poços por 4 h, a 4°C. Os microrganismos aderidos foram fixados com 200 µl de metanol 99% e após 15 min, o conteúdo dos poços foi removido. Após a secagem das placas, adicionou-se 200 µl de violeta de cristal a 2% em cada poço, durante 5 min, em seguida retirando-se o excesso com água. Após essa etapa adicionou-se 200 µl de ácido acético glacial 33% (v/v) a cada poço e leu-se a densidade óptica a 595 nm [21].

## **Resultados e discussão**

### **Atividade antimicrobiana do biossurfactante**

O biossurfactante Lunasan produzido em meio de baixo custo foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 56 para 25mN/m. O rendimento obtido após 144 horas de cultivo foi de 9 g/L, sendo a CMC de 0,025%. Após isolamento, o biossurfactante foi submetido a testes de atividade antimicrobiana e anti-adesiva, avaliados para várias

concentrações do biossurfactante ( $0,625 - 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) e comparados com uma variedade de linhagens de bactérias e leveduras. O biossurfactante testado apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos utilizados, embora, dependendo do microrganismo, o biossurfactante apresente diferentes concentrações efetivas. O biossurfactante isolado apresentou uma alta porcentagem de inibição contra os microrganismos *Streptococcus oralis* (68%), *Candida albicans* (57%) e *Staphylococcus epidermidis* (57,6%) na concentração mais alta testada (Tabela 1).

A atividade antimicrobiana contra vários microrganismos tem sido descrita. A Surfactina, por exemplo, um lipopeptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis*, tem sido descrita por suas propriedades antimicrobianas [1].

A atividade antibiótica da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* foi testada frente a bactérias e fungos. Todas as bactérias testadas, exceto o próprio *B. subtilis*, demonstraram susceptibilidade ao produto. *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria gram-negativa mais sensível, enquanto que *Echerichia coli*, *S. choterasius* e *S.marcescens* foram inibidas em menor grau. O lipopeptídeo também afetou o crescimento de bactérias gram-positivas principalmente *M. luteus* e *B. cereus*. O crescimento das leveduras e fungos testados não foi afetado pela presença do biossurfactante [18].

O biossurfactante bruto de *Lactobacillus lactis* 53 e *S. thermophylus* A mostraram uma atividade antimicrobiana contra *C. tropicalis* GB em baixas concentrações de biossurfactantes [24,25].

Alguns biossurfactantes, além de suas propriedades detergentes, podem apresentar em baixas concentrações, forte ação desestabilizante de membranas e assim, conferir propriedade antimicrobiana [4,8]. O interesse inicial pelos biossurfactantes foi originado em função de suas propriedades antimicrobianas. Os dois biossurfactantes mais estudados, o raminolipídeo e a surfactina, foram

primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968, respectivamente, por apresentarem estas características [16].

As bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos biossurfactantes do que as bactérias Gram-negativas, que são inibidas fracamente ou não são inibidas [11, 13]. *Candida bombicola* e *C. apicola* produzem biossurfactantes do tipo glicolípido em grande quantidade. Esses glicolípidos (soforolípidos) inibem o crescimento de *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *S. faecium* em concentrações de 6-29 mg/L. Outros glicolípidos inibem o crescimento não somente de bactérias Gram-positivas, mas também bactérias Gram-negativas tais como *E. coli* e *S. marcescens* [29].

Kitamoto et al. [11] citam que a atividade antimicrobiana de manosileritrolípido produzido por *Candida antarctica*, soforolípidos produzidos por *Candida apicola* e raminolípidos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* contra *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Todos os biossurfactantes citados apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos utilizados numa concentração que variou entre 7,8 mg/L a 800 mg/L. Somente o soforolípidos não apresentou atividade contra *C. albicans*. O fungo filamentoso *Aspergillus niger*, foi inibido pelo raminolípidos na concentração de 16 mg/L e pelo manosileritrolípido numa concentração acima de 400 mg/L, embora o soforolípidos não tenha causado qualquer inibição.

### **Atividade anti-adesiva do biossurfactante**

Os microrganismos empregam um mecanismo de sobrevivência pelo processo de adesão a superfícies e de formação de biofilmes. Eles se aderem à superfície através de complexos polissacarídicos, formando uma comunidade microbiana chamada biofilme, a qual protege seus habitantes de desidratação, de predadores, biocidas e outras condições ambientais extremas [7].

A atividade anti-adesiva do biossurfactante foi avaliada em algumas concentrações e comparada para uma variedade de linhagens de bactérias e leveduras (Tabela 2). O biossurfactante isolado Lunasan produzido por *C. sphaerica* apresentou alta atividade anti-adesiva contra todos os microrganismos testados. Considerando que o efeito da atividade anti-adesiva depende da concentração do surfactante e do microrganismo testado, o Lunasan, mesmo na menor concentração testada, ou seja, 0,625 mg ml<sup>-1</sup>, demonstrou grande potencial anti-adesivo, sendo os maiores percentuais de adesão obtidos para os microrganismos *P. aeruginosa*, *S. agalactiae*, *S. sanguis*<sup>12</sup>, *C. tropicalis*, *E. coli* e *S. salivarius*, com percentuais de inibição de 80 a 92%. Quase 100% de inibição da aderência ocorreram a altas concentrações. Uma função para biossurfactantes como armas de defesa em competição com a pós-adesão com outras linhagens de espécies tem sido sugerido para biossurfactantes produzidos por *S. mitis* e *S. mutans*. Além das atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais dos biossurfactantes, estes compostos também têm provado serem grandes inibidores da adesão microbiana e da formação de biofilmes. Por exemplo, o biossurfactante liberado por *S. mitis* reduziu a adesão de *S. mutans* [19]. Similarmente, *L. fermentum* RC-14 libera compostos surfactantes que podem inibir a adesão de bactérias uropatogênicas, incluindo *Enterococcus faecalis*. A adsorção do biossurfactante à superfície altera a hidrofobicidade, podendo causar interferência na adesão microbiana e em processos de dessorção [10].

Velraeds et al. [30] relataram a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfatante produzido por *Lactobacillus*. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes anti-adesivos para uso em catéteres visando diminuir a formação de biofilmes.

Várias bactérias têm sido reportadas como inibidoras da adesão de outras bactérias, tanto por exclusão, como pelo mecanismo de impedimento estérico [31]. Em

contraste, produtos microbianos como biossurfactantes condicionam a superfície à qual a bactéria irá se aderir, inibindo assim a adesão dessas últimas. Conseqüentemente, eles encontram aplicação na proteção de superfícies de instrumentos cirúrgicos onde a presença de microrganismos é indesejável [23].

## **Conclusões**

Os resultados obtidos indicam a possibilidade de utilização do biossurfactante Lunasan de *Candida sphaerica* em aplicações médicas, área de aplicação ainda não explorada para biossurfactantes obtidos de leveduras.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem às agências financiadoras FACEPE, CNPq, FINEP, PRONEX e a UNICAP, pelo uso de suas instalações e a CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

## **Referências**

1. Ahimou F, Jacques P, Deleu M (2001) Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 749-754
2. Brandão LVC (2001) Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Candida*, isoladas de solo de mata e solo poluído com chumbo. (doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco

3. Calvo C, Manzanera M, Silva-Castro GA, Uad I, González-López, J (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment* 407: 3634-3640.
4. Carrilo C, Teruel JA, Aranda FJ, Ortiz A (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1611: 91-97
5. Das P, Mukherjee S, Sen R (2009) Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71: 183–186
6. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356
7. Dunne Jr WM (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clin. Microbiol. Rev* 15: 155–166
8. Elving GJ, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Van Weissenbruch R, Albers FW (2002) Comparison of the microbial composition of voice prosthesis biofilms from patients requiring frequent versus infrequent replacement . *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 111: 200-203
9. Fischer W (1996) Molecular analysis of lipid macroamphiphiles by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 25: 129 -144

10. Heinemann C, Hylckama V, Van Johan ET, Janssen DB, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Reid G (2000) Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131, FEMS. Microbiol. Lett 90: 177– 180
11. Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. Journal of Bioscience and Bioengineering 94: 187-201.
12. Kuyukina MS. Ivshina IB. Philp JC. Christofi N. Dunbar SA. Ritchkova, MI (2001). Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. Journal of Microbiological Methods. .46:109-120.
13. Lang S, Katsiwela E, Wagner F (1989) Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Science Technology* 91(9): 363-366
14. Luna JM. Sarubbo LA. Campos-Takaki GM (2009) A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* .52: 785-793.
15. Luna JM. Rufino RD. Sarubbo LA. Campos-Takaki GM (2008). Produção de biosurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. *Exacta* .6: 209-215.
16. Maier RM (2003) Biosurfactants: evolution and diversity. *Adv. Appl. Microbiology* 52: 101-121

17. Muthusamy, K, Gopalakrishnan, S, Ravi, Tk, Sivachidambaram, P (2008) Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science* 94: 736-747.
18. Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM (2004) Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**: 336-341
19. Pratt- Terpstra IH, Busscher HJ (1989) Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. *Journal Colloid Interface Science* 129: 568-574
20. Rodrigues LR, Teixeira JA, Van Der Mei, HC, Oliveira R (2006) Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophiles* A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 53: 105 -112
21. Rodrigues LR, Teixeira JA, Van Der Mei HC, Oliveira R (2006) Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Coll. Surfaces B: Biointerfaces* 49: 79 – 86
22. Rodrigues LR, Banat IM, Van Der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R (2006) Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology* 100: 470-480

23. Rodrigues LR, Moldes A, Teixeira JA, Oliveira R (2006) Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal* 28 (2): 109-116

24. Rodrigues LR, Van Der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R (2004a) Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibit microbial adhesion on silicone rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 306 - 311

25. Rodrigues LR, Van Der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R (2004b) Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4408 – 4410

26. Rosenberg E (1986) Microbial surfactants. *Critical Reviews in Biotechnology* 3: 109-132.

27. Rufino RD, Sarubbo L A, Campos - Takaki GM (2007) Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 729-734

28. Sarubbo LA, Luna JM, Campos-Takaki GM (2006) Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP1002. *Electronic Journal of Biotechnology*. Online

29. Singh P, Cameotra S (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology* 22: 142-146

30. Velraeds-Martine MC, Vander Mei HC, Reid G, Busscher HJ (1996) Physiochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biological interfaces* 8: 51-61

31. Zai Rate G, Nader-Macias ME (2006) Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol* 43: 174 –180

Tabela 1 - Porcentagem de inibição de crescimento obtida para diferentes microrganismos utilizando biossurfactante produzido por *C. sphaerica* UCP 0995. Desvio padrão ( $\pm$ ) determinado em triplicada

Microrganismos	Biossurfactante ( $\text{mg ml}^{-1}$ )				
	0,625	1,25	2,5	5	10
<i>Lactobacillus casei</i>	5,5 $\pm$ 0,2	12 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 0,1	30 $\pm$ 0,4	40,4 $\pm$ 0,2
<i>Lactobacillus casei</i> 72	5,5 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 0,2	13 $\pm$ 0,4	25 $\pm$ 0,3	43,3 $\pm$ 0,1
<i>Lactobacillus reuteri</i> 104R	10 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,3	22 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,3	46,5 $\pm$ 0,1
<i>Lactobacillus reuteri</i> ML1	8,5 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 0,2	16 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 0,2	49 $\pm$ 0,2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7,3 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 0,3	35 $\pm$ 0,2	46 $\pm$ 0,2
<i>Streptococcus mutans</i>	14 $\pm$ 0,1	17,8 $\pm$ 0,1	22,6 $\pm$ 0,1	38,3 $\pm$ 0,1	40,2 $\pm$ 0,6
<i>Streptococcus mutans</i> NS	14,2 $\pm$ 0,3	15,6 $\pm$ 0,4	20 $\pm$ 0,3	23,8 $\pm$ 0,1	36 $\pm$ 0,1
<i>Streptococcus mutans</i> HG	22 $\pm$ 0,2	33,1 $\pm$ 0,1	45,6 $\pm$ 0,3	46 $\pm$ 0,4	48 $\pm$ 0,1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10,3 $\pm$ 0,6	15,4 $\pm$ 0,1	28 $\pm$ 0,1	32,2 $\pm$ 0,5	42,5 $\pm$ 0,2
<i>Streptococcus sanguis</i> 12	13,6 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 0,4	15,5 $\pm$ 0,5	28 $\pm$ 0,8	39 $\pm$ 0,1
<i>Streptococcus oralis</i> J22	11 $\pm$ 0,4	13,2 $\pm$ 0,3	15,2 $\pm$ 0,3	30,7 $\pm$ 0,4	68 $\pm$ 0,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8,3 $\pm$ 0,1	13,5 $\pm$ 0,2	25 $\pm$ 0,2	42 $\pm$ 0,1	57,6 $\pm$ 0,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,6 $\pm$ 0,1	20 $\pm$ 0,2	27,3 $\pm$ 0,3	32,2 $\pm$ 0,2	43,9 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,7 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1	12,5 $\pm$ 0,1	13,6 $\pm$ 0,4	47 $\pm$ 0,2
<i>Candida albicans</i>	12,5 $\pm$ 0,2	17,3 $\pm$ 0,3	32 $\pm$ 0,3	44,2 $\pm$ 0,1	57 $\pm$ 0,2

Tabela 2 - Taxas de inibição microbiana obtidas no ensaio de atividade anti - adesiva do biosurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP 0095, em microplaca. O tampão fosfato (PBS) é tido como controlo e ajustado para 0%, já que não ocorre inibição da adesão microbiana

Microrganismo	Biosurfactante (mg ml <sup>-1</sup> )				
	0,625	1,25	2,5	5	10
<i>Lactobacillus casei</i>	53 ± 0,1	53 ± 0,2	56 ± 0,1	67 ± 0,3	90 ± 0,2
<i>Lactobacillus casei</i> 72	59 ± 0,3	61 ± 0,2	65 ± 0,4	70 ± 0,2	72 ± 0,1
<i>Lactobacillus reuteri</i> 104R	41 ± 0,1	42 ± 0,1	45 ± 0,4	50 ± 0,2	55 ± 0,1
<i>Lactobacillus reuteri</i> ML1	26 ± 0,2	28 ± 0,1	30 ± 0,3	34 ± 0,2	40 ± 0,2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	80 ± 0,1	86 ± 0,2	88 ± 0,2	92 ± 0,3	100 ± 0,2
<i>Streptococcus mutans</i>	58 ± 0,1	64 ± 0,1	67 ± 0,1	80 ± 0,2	100 ± 0,1
<i>Streptococcus mutans</i> NS	60 ± 0,3	65 ± 0,2	68 ± 0,2	80 ± 0,3	100 ± 0,2
<i>Streptococcus mutans</i> HG	41 ± 0,2	42 ± 0,1	44 ± 0,2	47 ± 0,2	50 ± 0,1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	33 ± 0,3	40 ± 0,1	42 ± 0,1	47 ± 0,5	49 ± 0,2
<i>Streptococcus sanguis</i> 12	80 ± 0,3	83 ± 0,4	87 ± 0,1	98 ± 0,2	100 ± 0,1
<i>Streptococcus oralis</i> J22	77 ± 0,1	84 ± 0,1	88 ± 0,3	95 ± 0,4	97 ± 0,2
<i>Streptococcus salivarius</i>	92 ± 0,4	93 ± 0,2	95 ± 0,4	97 ± 0,4	100 ± 0,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11 ± 0,1	12 ± 0,1	13 ± 0,2	19 ± 0,1	22 ± 0,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	75 ± 0,2	82 ± 0,3	85 ± 0,3	90 ± 0,2	92 ± 0,1
<i>Echerichia coli</i>	89 ± 0,4	93 ± 0,2	96 ± 0,1	97 ± 0,2	99 ± 0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80 ± 0,2	82 ± 0,1	83 ± 0,3	89 ± 0,2	92 ± 0,2
<i>Candida albicans</i>	52 ± 0,3	56 ± 0,2	57 ± 0,1	64 ± 0,2	71 ± 0,2
<i>Candida tropicalis</i>	80 ± 0,3	85 ± 0,2	87 ± 0,1	98 ± 0,3	100 ± 0,1
<i>Rothia dentocariosa</i>	55 ± 0,3	57 ± 0,2	60 ± 0,4	68 ± 0,3	72 ± 0,2

**Artigo 4**

**Manuscrito a ser submetido ao Periódico Internacional: Journal of Bioscience and Bioengineering**

---

Fator de impacto: 2,009

## **Aplicação do Biossurfactante de Baixo Custo Lunasan Produzido Por *Candida sphaerica* na Remoção de Metais Pesados em Solo**

Juliana M. Luna<sup>1,3</sup>, Viviane K. Asfora<sup>2</sup>, Leonie A. Sarubbo<sup>3,4\*</sup>, G.M. Campos-Takaki<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil*

<sup>2</sup> *Programa de Pós- Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil*

<sup>3</sup> *Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) - UNICAP, Rua Nunes Machado, n. 42, Bloco J, Boa Vista, CEP: 50050-590, Recife-PE, Brasil*

<sup>4</sup> *Centro de Ciências e Tecnologia,- Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, Boa Vista, Recife-PE, Brasil*

\*Autores para correspondência: Tel.: +55-81-21194044, Fax: +55-81-21194043, E-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br); [leonie@unicap.br](mailto:leonie@unicap.br)

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o desempenho do biossurfactante aniônico “Lunasan” produzido pela *C. sphaerica* na remoção de metais pesados (Pb, Zn e Fe) contidos em solo coletado em uma indústria de baterias automotivas. Parâmetros importantes como concentração do surfactante (0,1, 0,25 e 2,5%), biossurfactante bruto ou isolado e o uso de combinação dos aditivos NaOH e HCl, comumente utilizados, foram investigados. Os resultados obtidos indicaram remoções de 86, 75 e 50% para Fe, Zn e Pb, respectivamente, quando se utilizou a solução do surfactante a 2,5%, embora o líquido metabólico tenha removido percentuais comparáveis às soluções do surfactante isolado. Por outro lado, o tratamento com o aditivo NaOH a 1% removeu 94% do Ferro e o HCl a 0,7% removeu 80% do chumbo, enquanto que 90% de zinco foi igualmente removido por ambos os aditivos, embora a lavagem com ácidos ou bases leve à redução da fertilidade e a alterações na composição química do solo. Os percentuais favoráveis de remoção dos metais, bem como a eficiência do surfactante bruto, aliado à produção em meio de baixo custo tornam a tecnologia de lavagem com o biossurfactante de *C. sphaerica* uma alternativa atrativa e promissora na remediação de solos contaminados com metais pesados.

Palavras – chave: biossurfactantes, metais, biorremediação

## **INTRODUÇÃO**

A contaminação dos solos por metais pesados surge como resultado das diversas atividades industriais, incluindo mineração, fundição de metais, produção de baterias automobilísticas, emissão de veículos e depósitos de resíduos industriais e a dispersão de cinzas provenientes dos processos de incineração (1).

A presença de metais pesados nos solos provoca sérios problemas uma vez que os mesmos não podem ser biodegradados, levando à contaminação dos sistemas biológicos e do subsolo pelo processo de lixiviação (2).

Com a finalidade de reduzir os custos associados ao tratamento de solos contaminados por metais pesados, diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas e implementadas, sendo duas bastante utilizadas. A primeira consiste em imobilizar os metais pesados numa matriz sólida fortemente ligada ao solo, minimizando a migração. Esta técnica, contudo, não consiste numa solução definitiva para o problema, considerando a impossibilidade de reaproveitamento do solo e a necessidade de monitoramento em longo prazo. A Segunda tecnologia promove a mobilidade do metal e sua migração para uma fase líquida por dessorção e solubilização. Esta tecnologia pode ser considerada uma solução permanente, permitindo ainda a reciclagem do solo remediado e conseqüentemente o reuso da terra. Normalmente, a lavagem do solo com ácidos e com agentes quelantes como o EDTA são os procedimentos mais aplicados. Contudo, a lavagem com ácidos leva a redução da fertilidade do solo e a alterações na composição química e física em virtude da dissolução de minerais (3), enquanto que a utilização de EDTA, por outro lado, é preocupante do ponto da saúde e de segurança, em função da sua resistência à degradação. A dificuldade de recuperação do metal pesado do complexo metal – EDTA também restringe o uso desta técnica.

Uma solução em potencial para a remediação de solos contaminados por metais e óleos consiste no uso de surfactantes, os quais podem ser adicionados em soluções, facilitando a solubilização, dispersão e dessorção dos contaminantes do solo, permitindo ainda sua reutilização. Vários surfactantes sintéticos têm sido avaliados em testes de descontaminação (4,5). Por outro lado, a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem levado às pesquisas a utilização de biossurfactantes. Recentemente, a viabilidade dos biossurfactantes para a remoção de metais tem sido demonstrada (6). A natureza iônica desses agentes, bem como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades de superfície os tornam candidatos em potencial para a remoção de metais pesados contidos em solos e sedimentos. Para Mulligan *et al.*(7) é possível a remoção de metais pesados pela utilização de várias concentrações de surfactante.

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de utilização de surfactantes biológicos, destacando-se os estudos com a surfactina e com os ramnolipídios, ambos de origem bacteriana, e de soforolipídeos originados de leveduras (8, 9,10,11,12).

Mulligan *et al.* (7) utilizaram surfactina de *Bacillus subtilis* para o tratamento de solos e sedimentos contaminados por Zn, Cu, Cd, óleo e graxa. Maslin e Maier (13) observaram que o biossurfactante do tipo ramnolipídio pode diminuir a toxicidade e aumentar a degradação de poluentes orgânicos através de uma complexação de metais pesados. Ochoa – Loza *et al.* (10) observaram uma complexação de metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio por um mono ramnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Lang (14) sugere que estes resultados podem ser bastante promissores na remoção de metais pesados em solos contaminados.

Nesse sentido, a aplicação de um novo biossurfactante Lunasan de baixo custo produzido pela levedura *Candida sphaerica* foi avaliado quanto ao potencial de remoção de metais pesados contidos em solo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Microrganismo** *Candida sphaerica* (UCP 0995), utilizada como microrganismo produtor de biossurfactante, isolada do solo contaminado por metais do município de Belo Jardim (15) mantida em meio YMA (Yeast Mold Ágar) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

**Substratos** Dois resíduos industriais foram utilizados como substratos para a produção do biossurfactante. Um resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal de soja, gentilmente cedido pela ASA LTDA, Recife-PE, foi utilizado como substrato insolúvel, enquanto que a milhocina, resíduo da fabricação de produtos à base de milho, gentilmente cedido pela Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, foi utilizado como substrato solúvel.

**Solo** Amostras de materiais de solo foram coletadas no município de Belo Jardim, região de indústria de baterias automotivas, que se localiza na região agreste setentrional do Estado de Pernambuco.

**Identificação dos metais pesados no solo** Foi utilizado um sistema portátil de fluorescência de raio X ED-XRF. O sistema é constituído de um tubo de raios X, um detector de Si, multicanal, amplificador e Notebook para aquisição de dados. O aparelho de raio X (marca MOXTEK, modelo 40kV MAGNUM) Possui um alvo de tungstênio e pesa 450 gramas, com comprimento de 5,53cm e largura de 2,86cm.

**Produção do biossurfactante** A produção do biossurfactante foi realizada no meio á base de água destilada contendo 9% de resíduo da refinaria de óleo de soja e 9% de milhocina. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 27 °C.

**Isolamento do biossurfactante** Após 144 horas de cultivo da *Candida sphaerica*, o líquido metabólico livre de células foi submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com HCl 6M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso durante 24 horas a -15°C, as amostras foram centrifugadas à 4000g por 30 minutos, lavadas com metanol gelado por duas vezes e secas em estufa a 37°C por 24-48 h, até secagem, e mantidas em dessecador até peso constante, sendo o rendimento em produto isolado calculado em g/L. Todas as análises foram feitas em triplicata.

**Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)** A tensão superficial e a CMC foram medidas em tensiômetro automático (Modelo Sigma 70, KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de NUOY. A CMC foi determinada, partindo-se de uma solução de concentração conhecida do biossurfactante isolado.

**Determinação da carga iônica do biossurfactante** A carga iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de difusão dupla em Agar modificada (16). Duas fileiras regularmente espaçadas de poços foram feitas em ágar de baixa viscosidade (solução a 1 %). Os poços das fileiras inferiores foram preenchidos com a solução do surfactante isolado. Cada poço da fileira superior foi preenchido com o

dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02 M, enquanto que a substância catiônica foi o cloreto de bário, na concentração de 0,05 M. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativas do caráter iônico do biossurfactante, foi monitorado durante 48 horas a temperatura ambiente.

**Determinações químicas e físicas do solo** As determinações químicas e físicas do solo foram realizadas segundo Standard Methods (17). As características do solo contaminado estão ilustradas na Tabela 1.

**Quantificação dos metais pesados do solo** A análise do teor dos metais pesados no solo coletado no município de Belo Jardim foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica pelo método de extração ácida segundo o “Standard Methods” (17). Uma quantidade de aproximadamente 10 g de cada amostra foi macerada em almofariz, passando por malha de 29 mesh, pesada e 1,0g acrescentada de 20,0 mL de água e 10,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e colocado em chapa de aquecimento por 1 hora a 200°C. O material obtido foi filtrado e transferido para um balão volumétrico de 100,0 ml de capacidade, aferido o volume com água destilada e determinada a concentração dos metais em absorbância de 217 a 283, em espectrofotômetro de absorção atômica.

**Tratamento do solo com as soluções do biossurfactante** O processo de lavagem do solo foi realizado em função da concentração da solução do biossurfactante (0,1, 0,25, e 2,5%). Para seleção da melhor concentração de biossurfactante para remoção dos metais pesados, 1g de solo foi colocado em tubos de centrifuga, sendo adicionados 25 mL da solução do biossurfactante nas diferentes

concentrações descritas acima. O líquido metabólico livre de células obtido após 144 horas de cultivo também foi testado. A amostra de solo foi paralelamente tratada com H<sub>2</sub>O destilada com a finalidade de se determinar a remoção dos metais pesados por mistura física (controle). Soluções de NaOH a 1% e HCl a 0,7%, bem como combinações de soluções do biossurfactante e do líquido metabólico com 0,7% de HCl e com 1% de NaOH como aditivos também foram utilizadas. As amostras foram agitadas durante 24 horas e centrifugadas a 5000 g. Os sobrenadantes foram filtrados e a concentração de metal determinada por espectrofotometria de absorção atômica. A porcentagem de remoção de metal foi determinada com base no conteúdo inicial de metal no sedimento e os resultados foram apresentados como % de remoção do metal.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os possíveis mecanismos para a extração de metais pesados por biossurfactantes incluem troca iônica, precipitação-dissolução e associação ao contra-íon. Considera-se que os metais são removidos através da formação de complexos com o surfactante, na superfície do solo, sendo destacados do solo pela redução da tensão interfacial e se associando, conseqüentemente, às micelas surfactante(18). Os surfactantes aniônicos fornecem resultados satisfatórios uma vez que os cátions dos metais têm afinidade pelos surfactantes negativamente carregados, sendo também possível que o biossurfactante permita uma maior remoção em função de sua capacidade de redução da tensão interfacial (19).

Segundo a literatura, é importante que os biossurfactantes usados no tratamento de solos tenham uma interação mínima com o solo. Em outras palavras, é desejável que a maioria dos biossurfactantes permaneça na fase aquosa. Entretanto, as grandes concentrações de biossurfactante normalmente requeridas para a remoção

efetiva de metais pesados em solo se devem à sorção desses ao solo (20,21). Logicamente, o comportamento adsorptivo de um biossurfactante irá depender de suas características moleculares, como por exemplo, carga e hidrofobicidade, bem como das características do solo (21).

Nesse sentido, o biossurfactante aniônico “Lunasan” de baixo custo produzido a partir do cultivo de *C. sphaerica* em dois resíduos industriais e capaz de reduzir a tensão superficial da água para 25 mN/m foi testado na remoção dos metais pesados contidos em amostras de solo de uma indústria de baterias automotivas.

Inicialmente, a presença dos metais Zn, Fe e Pb foi confirmada através da técnica de fluorescência de raios X ED-XRF, sendo as concentrações dos metais encontrados na amostra do solo da fábrica de baterias automotivas (3038 mg/L de Pb, 1877 mg/L de Fe, e 1470 mg/L de Zn) determinadas por absorção atômica.

Soluções do biossurfactante isolado em concentrações superiores à sua CMC (0,025%), foram testadas para garantir a formação das micelas, estruturas eficientes na mobilização de metais pesados, através do tratamento do solo. A remoção dos metais pelo líquido metabólico livre de células também foi avaliada. A possibilidade de aumentar os percentuais de remoção dos metais foi testada pela combinação do surfactante com os aditivos NaOH e HCl, enquanto que a água destilada foi usada como controle.

Os resultados para os tratamentos do solo com as diferentes soluções testadas estão ilustrados na Tabela 2.

Os resultados obtidos demonstraram que o Ferro foi o metal mais removido do solo pelas soluções removedoras testadas, seguido de zinco, em quantidades um pouco menores e de chumbo, mostrando que o biossurfactante apresentou maior afinidade pelo Ferro e pelo Zinco presentes no solo. Segundo Ochoa-Loza *et al.* (10), a afinidade de um surfactante varia entre os diferentes metais.

As soluções dos aditivos NaOH a 1% (pH 12) e HCl a 0,7% (pH 2,0) removeram maiores quantidades dos metais, ou seja, a base removeu 94% do Ferro e o ácido removeu 80% do chumbo, enquanto que 90% de zinco foi removido por ambos os HCl e NaOH. É importante ressaltar, entretanto, que o tratamento com ácidos ou bases reduz a fertilidade e provoque alterações na composição química dos solos.

Hong *et al.* (1) descrevem a influência do pH na eficiência da remoção de metais pesados pelo biossurfactante de plantas saponina. Remoções de 58% de Pb e de 85-98% de Zn foram obtidas em pH 3,0, enquanto que o aumento do pH para 7,0 diminuiu acentuadamente a remoção dos metais.

Não houve diferenças acentuadas nos percentuais de remoção entre o líquido metabólico e as soluções do biossurfactante isolado, indicando que o biossurfactante bruto pode ser utilizado no tratamento de solos contaminados com metais pesados, o que representa uma redução dos custos de produção da ordem de 60%, considerando que este é o percentual descrito na literatura para as etapas de purificação dos surfactantes obtidos por via fermentativa (22).

Comparando-se as três concentrações de surfactante testadas, observou-se que o aumento da concentração de 0,1 para 2,5% favoreceu a remoção dos metais, especialmente no caso do Pb. Remoções de 86, 75 e 50% foram obtidas para Fe, Zn e Pb, respectivamente, quando se utilizou a solução do surfactante a 2,5%, embora o líquido metabólico tenha removido percentuais comparáveis às soluções do surfactante isolado, como discutido anteriormente. O tratamento físico realizado com água destilada como controle removeu cerca de 10% dos metais presentes no solo.

A saponina, que apresenta uma CMC de 0,1% e tensão sauperficial de 36 mN/m, foi testada entre 0,1 e 10%, sendo a remoção dos metais pesados contidos no solo proporcional à concentração, embora a solução a 3% tenha sido selecionada para

estudos posteriores, uma vez que concentrações maiores apenas aumentaram o percentual de remoção em pequenas proporções (1).

Com relação à utilização dos aditivos HCl e NaOH juntamente com as soluções surfactantes, observou-se que a presença da base ou do ácido aumentou o percentual de remoção dos metais pelo líquido metabólico e pelas soluções do biossurfactante a 0,1 e 0,25% , enquanto que o efeito do NaOH e do HCl não potencializou a remoção dos metais pela solução do surfactante a 2,5%, indicando que, nessa concentração, a remoção ocorreu, basicamente, devido a interação eletrostática entre as moléculas do biossurfactante, presentes em maiores quantidades na solução, e os metais.

A possibilidade do uso de biossurfactantes na remoção de metais pesados tem sido demonstrada em alguns trabalhos realizados a nível laboratorial. Mulligan *et al.* (8) demonstraram a aplicabilidade de biossurfactantes na remoção de metais pesados contidos em solos. Inicialmente, o sofrorolípido de *Torulopsis bombicola* cultivada em glicose e óleo de soja, com uma CMC de 0,8g/L (0,08%) e capacidade de reduzir tensão superficial para 34 mN/m foi testado. A solução do sofrorolípido a 4% não removeu o Zn contido no solo, removendo apenas 3% do Cu. A adição de 1% de NaOH foi benéfica em associação a 4% do sofrorolípido, aumentando a remoção para 7 e 36% de Zn e Cu, respectivamente. A remoção mais significativa de Cu e Zn ocorreu com o uso de 0,7% de HCl e 4% do sofrorolípido, atingindo uma remoção de 16 e 37% de Zn e Cu, respectivamente. Esse percentual foi aumentado pela realização de uma série de cinco lavagens, atingindo percentuais de remoção de 100 e 50% de Zn e Cu pela combinação de 0,7% de HCl e 4% do sofrorolípido. Já o raminolípido de *Pseudomonas aeruginosa* produzido em meio mineral contendo 4% de glicose, com uma CMC de 0,003% e tensão superficial de 26 mN/m possibilitou a remoção de 20 e 35% de zinco e cobre, respectivamente, para uma elevada concentração, de 12%, uma vez que a solução do raminolípido a 2% removeu apenas 5 e 10 de zinco e cobre,

respectivamente. A adição de 1% de NaOH à solução do surfactante a 2%. Por outro lado, aumentou significativamente a remoção do cobre (de 10 para 28%), mas diminuiu a remoção do zinco (de 5 para 3%).

Mulligan *et al.* (6) demonstraram o aumento da remoção de Zn quando a surfactina a 2% foi usada em combinação com a base, enquanto que a remoção de Cu não foi afetada pela presença do NaOH. Já a associação da base com 0,5% do raminolipídeo favoreceu a remoção de ambos os metais para 65 e 18%, quando comparado com a base sozinha. Por outro lado, 100% de remoção de cobre e zinco foram obtidas com ou sem a adição de 4% do soforolipídeo a 0,7% de HCl. A redução da concentração de ácido (0,3%) permitiu concluir que a presença do surfactante aumentou a remoção de ambos os metais em comparação com o ácido sozinho, de 38% para 60% de zinco e de cerca de 6% para 25% de cobre. Já a remoção de cobre diminuiu quando o ácido foi adicionado ao surfactante, comparado com o surfactante sozinho, que removeu 38% do metal.

Vale ressaltar que o biossurfactante de *C. sphaerica*, além de ser obtido a partir de substratos de baixo custo, foi mais eficiente na remoção dos metais, uma vez que concentrações inferiores foram utilizadas, quando comparadas às concentrações dos biossurfactantes utilizados por Mulligan *et al.* (6,7).

Daharazma e Mulligan (23) observaram que os percentuais de remoção dos metais pesados em solo aumentaram linearmente com o aumento da concentração do raminolipídeo testado. A utilização de 5% do raminolipídeo removeu 37% de Cu, 7,5% de Zn e 33,2% de Ni. Ao contrário dos resultados aqui descritos, que demonstraram a eficiência dos aditivos usados isoladamente, a adição de NaOH à solução de 0,5% do raminolipídeo aumentou a remoção de cobre para 28,3% e do Ni para 11,5%, sendo essas remoções 9, 4 e 6 vezes maiores para o Cu, Zn e Ni, respectivamente, quando comparadas com as remoções pela base isoladamente (NaOH a 1%).

É interessante observar também que os metais Fe e Zn foram removidos em maiores quantidades pela base isoladamente ou combinada com o biossurfactante, enquanto que a remoção do Pb foi favorecida pelo ácido isoladamente ou em associação com o biossurfactante.

Segundo Hong *et al.* (1), o Na<sup>+</sup> pode competir com os metais pesados pelo biossurfactante, formando um complexo Na-surfactante. É possível que o Na<sup>+</sup> do NaOH tenha competido com o Pb pelo biossurfactante, reduzindo, com isso, a remoção do metal pela base quando comparada com a utilização do ácido.

Avaliando a influência da concentração do biossurfactante em associação com os aditivos, observou-se que apenas a solução do surfactante na menor concentração, ou seja, 0,25%, em combinação com o ácido, foi mais favorável à remoção dos três metais presentes no solo, enquanto que apenas a combinação da solução do surfactante a 2,5% com a base tenha removido o Pb, que não foi removido pela utilização de concentrações menores do biossurfactante em associação com o NaOH. Mulligan *et al.* (7) também observaram que a combinação de menores concentrações do raminolipídeo (0,5%) com o NaOH removeu quantidades maiores dos dois metais do que quando a base foi combinada com o surfactante a 2%. Os autores também observaram, para a surfactina de *Bacillus subtilis* que, quando a concentração do surfactante foi reduzida para 0,25%, em presença de 1% da base, a remoção de Zn e Cu aumentou.

Dois agentes ambientalmente compatíveis, ou seja, um raminolipídeo (0,5%), com CMC de 0,005% (0,05g/L) e a CMCD (carboximetilciclodextrina) (5,3%) foram testados para a remoção de metais adsorvidos em dois tipos de solo. Após dez lavagens consecutivas, o raminolipídeo foi capaz de remover 14,2 e 15,3% do Pb contido nos solos testados, enquanto que a CMCD removeu 5 e 13,4% do metal contido nos solos testados (12).

Os resultados de remoção com o biossurfactante de *C. sphaerica*, de um modo geral, foram comparáveis aos obtidos com as soluções de HCl e NaOH, demonstrando a possibilidade de substituição desses agentes de tratamento por agentes mais compatíveis com o meio ambiente. Vale ressaltar, ainda, a versatilidade desses agentes no que se refere às suas propriedades anfipáticas, as quais permitem que os biossurfactantes possam ser usados na remoção concomitante de diferentes tipos de poluentes ambientais como os metais pesados e os hidrocarbonetos presentes em derramamentos de petróleo e derivados, como descrito por Mulligan *et al.* (23).

## **CONCLUSÕES**

Os resultados demonstram que a tecnologia de lavagem com biossurfactantes é promissora na remediação de solos contaminados por metais pesados. Essa tecnologia pode ser aplicada para a recuperação conjunta de vários contaminantes do solo, como os hidrocarbonetos de petróleo em adição aos metais pesados. A compatibilidade ambiental, bem como a possibilidade de associação a técnicas convencionais de remediação como a escavação, a extração térmica e a eletrocínética impulsionam o desenvolvimento dessa tecnologia alternativa em função dos altos custos associados aos métodos convencionais de tratamento. Contudo, para o futuro desenvolvimento dessa técnica, muitos fatores devem ser cuidadosamente avaliados. A composição do solo, sua mineralogia, o conteúdo em matéria orgânica, a distribuição dos metais, bem como a presença de metais competidores e de outros contaminantes, além da seleção do tipo e da concentração do biossurfactante e da operacionalização em batelada ou contínua, são alguns dos parâmetros que devem ser profundamente investigados para o sucesso efetivo da implantação definitiva dessa técnica biotecnológica.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências financiadoras CNPq, CAPES e à Universidade Católica de Pernambuco, pelo uso de suas instalações.

## REFERÊNCIAS

1. **Hong, K.J.; Tokunaga, S.; Kajiuchi, T.** Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. *Chemosphere*, **49**,379-387(2002).
2. **Morrison, G.M.P.** Urban storwater pollution: heavy metal studies of natural waters (a review). Research Report of Middlesex Polytechnic Research & Consultancy, Sweden, (1983).
3. **Reed, B.E.; Carriere, P.C.; Moore, R.J.** Flushing of a Pb (II) contaminated soil using HCL, EDTA and Ca Cl<sub>2</sub>, *J. Environ*, **122**, 48-50(1996).
4. **Ellis,W.D.; Payne, J.R.; Mcnabb, G.D.** Treatment of contaminated soils with aqueous surfactants. U.S. EPA 600/2-85/129, (1985).
5. **Nash, J.; Traver, R.P.; Downey, D.C.** Surfactant enhanced in situ soil Washing. US.EPA HWERL. Edilsin, New Jersey, (1987).
6. **Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F.** Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, **60**, 371–380 (2001).
7. **Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F.** Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology*, **33**, 3812–3820 (1999).

8. **Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F.** On the use of biosurfactant for the removal of heavy metals from oil contaminated soil. *Environmental Progress*, **18**, 50-54(1999).
9. **Herman, D.C.; Artiola, J.F.; Miller, R.M.** Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science and Technology*, **29**, 2280–2285(1995).
10. **Ochoa-Loza F.J.; Noordman W.H.; Janssen D.B.; Brusseau M.L.; Maier R.M.** Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. *Chemosphere*, **66**,634-1642 (2007).
11. **Tan, H.; Champion, J.T.; Artiola, J.F.; Brusseau, M.L.; Miller, R.M.** Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science and Technology*, **28**, 2402–2406 (1994).
12. **Neilson, J.W.; Artiola, J.F.; Maier, R.M.** Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. *Journal of Environmental Quality*, **32**,899–908 (2003).
13. **MASLIN, P. and MAIER, R.** Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene in organic-metal co-contaminated soils. *Bioremediation Journal*, **4**, 295-308(2000).
14. **Lang S, Katsiwela E, Wagner F** Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Science Technology* **91(9)**: 363-366(1989).
15. **Brandão, L.V.C.** Produção de biosurfactantes por leveduras do gênero *Candida*, isoladas de solo de mata e solo poluído com chumbo. tese (doutorado) UNESP(2001).
16. **Meylheuc, T.; Van Oss, C. J.; Bellon-Fontaine, M. N.** Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the biohesion of

*Listeria monocytogenes* LO28. Journal of Applied Microbiology, **91**, 822-832 (2001).

17. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19ed. England: AWWA WEF APHA, 1995.

18. **Peng, J.-F.; Song, Y.-H. ; Yuan, P.; Cui, X.-Y.; Qiu, G.-L.** The remediation of heavy metals contaminated sediment. Journal of Hazardous Materials, **161**,633-640 (2009).

19. **Asçi, Y.; Nurbas, M.; Açıkel, Y. S.** Sorption of Cd (II) onto kaolin as soil component and desorption of Cd (II) from kaolin using rhamnolipideo biosurfactant. Journal of Hazardous Materials, 50-56, 2007.

20. **Asçi, Y.; Nurbas, M.; Açıkel, Y. S.** A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. Journal of Hazardous Materials, **154**,663-673( 2008).

21. **Calvo, C.; Manzanera, M.; Silva-Castro, G.A.; Uad, I.; González-López, J.** Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of the Total Environment, **407**, 3634-3640 (2009).

22. **Dahrazma, B. and Mulligan, C.N.** Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. Chemosphere, ( 2007) (in press).

23. **Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F.** An evolution of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. Journal of Hazardous, 145-163 (2001).

Tabela 1 – Determinações químicas e físicas do solo contaminado do município de  
Belo Jardim

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Na <sup>+</sup>	0.10 Cmolc/dm <sup>3</sup>
Ca <sup>2+</sup>	0.30 Cmolc/dm <sup>3</sup>
Mg <sup>2+</sup>	1.45 Cmolc/dm <sup>3</sup>
K <sup>+</sup>	0.05 Cmolc/dm <sup>3</sup>
H <sup>+</sup>	0.32 Cmolc/dm <sup>3</sup>
Capacidade de troca de cátions	2.2 Cmolc/dm <sup>3</sup>
Saturação de bases	86%
Condutividade elétrica	3.4µS
Calagem	0.5 t/ha
pH	8.5
Densidade de partículas	1.40 g/cm <sup>3</sup>
Densidade residual	3.98 g/cm <sup>3</sup>
Areia grossa	2%
Areia fina	4%
Silte	71%
Argila	23%
Argila natural	23%
Classe textural	siltoso
Umidade residual	14.40%
0.33 Atm	28.54%
15 Atm	11.31%
Água disponível	17.23%
Pb	3038 mg/L
Fe	1877 mg/L
Zn	1470 mg/L

Tabela 2 – Remoção dos metais pesados ferro, zinco e chumbo contidos no solo do Município de Belo Jardim pelos tratamentos utilizados

Tratamentos	Remoção (%)		
	Zinco	Ferro	Chumbo
Água destilada	13	10	12
Solução de NaOH a 1%	90	94	56
Solução de HCl a 0,7%	90	90	80
Líquido metabólico	70	87	30
Líquido metabólico + HCl a 0,7%	75	90	40
Líquido metabólico + NaOH a 1%	80	90	40
Solução do biossurfactante a 0,1%	65	83	25
Solução do biossurfactante a 0,1% + 0,7% HCl	70	83	30
Solução do biossurfactante a 0,1% + 1% NaOH	75	90	0
Solução do biossurfactante a 0,25%	57	78	30
Solução do biossurfactante a 0,25% + 0,7% HCl	70	85	40
Solução do biossurfactante a 0,25% + 1% NaOH	85	85	0
Solução aquosa do biossurfactante a 2,5%	75	86	50
Solução do biossurfactante a 2,5% + 0,7% HCl	65	75	10
Solução do biossurfactante a 2,5% + 1% NaOH	80	82	50

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

- A utilização de planejamentos fatoriais como ferramenta estatística é de grande importância na formulação de experimentos microbiológicos.
- O uso dos dois substratos de baixo custo foi favorável à produção do biossurfactante.
- *Candida sphaerica* apresenta grande potencial como microrganismo produtor de compostos com atividade de emulsificação e atividade surfactante.
- O biossurfactante presente no líquido metabólico não apresenta alterações significativas quando submetido a diferentes temperaturas, pH's e concentrações de NaCl.
- O biossurfactante é isolado em grande quantidade, considerando os experimentos em batelada.
- A CMC do biossurfactante produzido foi inferior às concentrações micelares descritas para surfactantes de leveduras, demonstrando a eficiência da biomolécula.
- O biossurfactante produzido foi caracterizado como um glicolípido de natureza aniônica.
- O biossurfactante apresentou atividades biológicas significantes, demonstrando potencial de aplicação na área médica.
- O potencial de aplicação do biossurfactante na biorremediação foi demonstrado pelos percentuais de remoção de Ferro, chumbo e zinco em solos contaminados.
- Os resultados de remoção com o biossurfactante foram comparáveis aos obtidos com soluções ácidas/básicas, possibilitando a substituição desses

agentes de tratamento comumente utilizados por agentes mais compatíveis com o meio ambiente.

- Os elevados percentuais de remoção dos metais pesados pelo líquido metabólico livre de células, em combinação com o uso de substratos de baixo custo, aumentam as chances de uso do biossurfactante bruto, uma vez que a purificação do produto torna-se desnecessária para sua aplicação industrial.