

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ GALDINO RIBEIRO

**BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO NA
FORMULAÇÃO DE BISCOITO TIPO *COOKIE***

Recife
2018

BEATRIZ GALDINO RIBEIRO

**BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO NA
FORMULAÇÃO DE BISCOITO TIPO *COOKIE***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leonie Asfora Sarubbo

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Jenyffer Medeiros Campos Guerra

Recife

2018

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

Ribeiro, Beatriz Galdino

Biossurfactante produzido por leveduras para aplicação na formulação de biscoito tipo *cookie* / Beatriz Galdino Ribeiro. – 2018.

90 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jenyffer Medeiros Campos Guerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2018. Inclui referências.

1. Biotecnologia – Indústria. 2. Agentes ativos de superfícies. 3. Fungos
4. Leveduras. I. Sarubbo, Leonie Asfora (Orientadora). II. Guerra, Jenyffer Medeiros Campos (Coorientadora). III. Título.

668.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 436

BEATRIZ GALDINO RIBEIRO

**BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO NA
FORMULAÇÃO DE BISCOITO TIPO *COOKIE***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 06/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Profa. Dra. Juliana Moura de Luna
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Dra. Rita de Cássia Freire Soares da Silva
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, por toda a força, amor e misericórdia a mim doados para o êxito deste trabalho. Também à Nossa Senhora por todo auxílio e proteção durante esta caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, por inicialmente me aceitar no grupo de pesquisa e me dar um voto de confiança para a construção deste trabalho. Obrigada por sua valiosa orientação e compreensão pelas minhas ausências justificadas.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Jenyffer Campos Guerra, pela ajuda, apoio, conhecimento compartilhado, compreensão e por todas as dúvidas tiradas ao longo deste período.

Ao grupo de pesquisa em biossurfactantes da Unicap, por toda a colaboração e contribuição científica durante o tempo de pesquisa.

À professora Dra. Jaciana Aguiar da UFPE e seu aluno Msc. Bruno Iraquitan, pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade; e ao técnico do Departamento de Bioquímica, Bruno Veras, pelo auxílio nas análises de atividade antioxidante.

À toda minha família, em especial meus pais, Jonas Calixto e Maria do Socorro Galdino, pelo incentivo aos meus estudos e por acreditarem na minha capacidade de ir além. Sou grata a Deus por me presentear com pais maravilhosos! Amo vocês!

À minha tia Jonaide Ribeiro, que sempre se alegrou com minhas conquistas e me incentivou a buscar sempre o melhor!

À minha irmã Amélia Ribeiro, por sempre me incentivar e me ajudar no que precisava. Por todos os ensinamentos sem medida na área de biologia que me ajudaram na conclusão deste trabalho; por ser fonte de inspiração e exemplo de dedicação para mim. Te amo!

Ao meu amor Prudenciano José, pela compreensão e amor nos momentos de ausência, companheirismo e apoio nos períodos difíceis dessa caminhada; por não medir esforços para me ajudar sempre, meu muito obrigada!

Aos colegas do laboratório de origem animal – Leite e Carnes, em especial à Márcia Monteiro, pela amizade e por todas as caronas, as quais me ajudaram bastante no andamento dos experimentos.

A todos os colegas do laboratório de engenharia ambiental e da qualidade (LEAQ), em especial às professoras Dra. Marta Duarte e Dra. Daniella Napoleão, pela compreensão e auxílio para conclusão desta etapa de meu crescimento profissional.

Aos funcionários da Central Analítica do DQF, Departamento de Bioquímica, de Nutrição e de Engenharia Química– UFPE, do Laboratório de Combustíveis – LAC/UFPE, do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco e do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE pela realização de algumas análises essenciais para o meu trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram e estiveram na torcida por mais uma conquista minha.

RESUMO

A utilização dos biossurfactantes desperta grande interesse industrial em função da diversidade de estruturas e produção a partir de fontes renováveis, obtendo produtos resistentes às técnicas de processamento utilizadas nas indústrias. As leveduras conseguem sintetizar biossurfactantes e algumas não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, podendo utilizar seus metabólitos em formulações alimentícias. Desta forma, este trabalho objetivou produzir, caracterizar e aplicar os biossurfactantes produzidos por *Candida utilis* UFPEDA 1009 e *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670 na formulação de biscoitos tipo *cookie*. *C. utilis* foi cultivada em meio mineral contendo 6% de óleo de canola residual de fritura e 6% de glicose, enquanto que *S. cerevisiae* em seis diferentes meios. Assim, a tensão superficial e interfacial, índice de emulsificação (E_{24}), rendimento, composição físico-química e caracterização estrutural (FT-IR, RMN e GC/FID), bem como microscopia das emulsões e análise térmica foram realizadas nos biossurfactantes. Em última etapa, estes foram incorporados à massa de biscoito substituindo a gordura animal, sendo medidas suas propriedades físicas e analisado o perfil de textura antes e após cocção. O melhor meio de obtenção do biossurfactante utilizando-se *S. cerevisiae* foi o meio composto por 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina, com os melhores resultados de tensão superficial ($26,64 \text{ mN.m}^{-1}$) e E_{24} (37,50 a 94,58%), com tensão interfacial de $9,12 \text{ mN.m}^{-1}$. Para o produto de *C. utilis*, estes resultados foram de, respectivamente, $35,33 \text{ mN.m}^{-1}$, 35,19 a 37,04% e $2,53 \text{ mN.m}^{-1}$. Avaliando-se as metodologias de extração, a desenvolvida em laboratório apresentou maior viabilidade: $5,84 \text{ g.L}^{-1}$ (*S. cerevisiae*) e $24,22 \text{ g.L}^{-1}$ (*C. utilis*). A Concentração Micelar Crítica (CMC) para os biossurfactantes produzidos por *S. cerevisiae* e *C. utilis* foram $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Na análise físico-química, o produto de *S. cerevisiae* apresentou 80,04% de lipídeos e 19,64% de carboidratos em sua composição, já o de *C. utilis*, 96,43% de lipídeos e 3,21% de carboidratos, sendo confirmada suas estruturas por meio dos espectros de infravermelho e RMN. No perfil de ácidos graxos os maiores percentuais foram de ácido linoleico (50,58%) (*S. cerevisiae*) e ácido oleico (68,63%) (*C. utilis*) e as emulsões ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e $2 \times \text{CMC}$) apresentaram-se estáveis. A análise térmica mostrou que ambos são estáveis à temperatura de aplicação, já que tiveram perda de massa insignificante em temperatura até 200°C . Além disso, os biossurfactantes não apresentaram potencial citotóxico frente linhagens de fibroblastos (L929) e macrófagos (RAW 264.7) de camundongos. Incorporando os biossurfactantes na massa de biscoito, não houve diferenças significativas nas propriedades físicas e físico-químicas após cocção. Na análise do perfil de textura antes da cocção, a

substituição da gema pelos biossurfactantes mostrou-se significativa em todos os parâmetros avaliados, com resultados de firmeza, coesividade e elasticidade do produto de *S. cerevisiae* mais próximos aos da formulação padrão. Após cocção, a firmeza foi significativa apenas com a substituição do biossurfactante de *C. utilis*, uma vez que este apresentou teor de lipídeos elevado, resultando em um biscoito mais macio e elástico. Portanto, os biossurfactantes apresentam potencial de aplicação na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Alimentos. Bioemulsificantes. Caracterização. Índice de Emulsificação. Tensão superficial.

ABSTRACT

The use of biosurfactants arouses great industrial interest due to the diversity of structures and production from renewable sources, obtaining products resistant to the processing techniques used in the industries. Yeasts can synthesize biosurfactants and some do not present risks of toxicity and pathogenicity, being able to use their metabolites in food formulations. In this way, this work aimed to produce, characterize and apply the biosurfactants produced by *Candida utilis* UFPEDA 1009 and *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670 in the formulation of cookie type cookies. *C. utilis* was grown in mineral medium containing 6% canola frying oil and 6% glucose, whereas *S. cerevisiae* in six different media. Thus, surface and interfacial tension, emulsification index (E_{24}), yield, physical-chemical composition and structural characterization (FT-IR, NMR and GC / FID), as well as emulsion microscopy and thermal analysis were performed in the biosurfactants. In the last step, these were incorporated into the cookie dough replacing the animal fat, its physical properties being measured and the texture profile analyzed before and after cooking. The best way of obtaining the biosurfactant using *S. cerevisiae* was the medium composed of 1% soybean frying oil and 1% corn oil, with the best surface tension results (26.64 mN.m^{-1}) and E_{24} (37.50 to 94.58%), with interfacial tension of 9.12 mN.m^{-1} . For the *C. utilis* product, these results were, respectively, $35. \text{ mN.m}^{-1}$, 35.19 at 37.04% and 2.53 mN.m^{-1} . It was evaluated the extraction methodologies, the one developed in the laboratory presented greater viability: 5.84 g.L^{-1} (*S. cerevisiae*) and 24.22 g.L^{-1} (*C. utilis*). The critical Micellar Concentration (CMC) for the biosurfactants produced by *S. cerevisiae* and *C. utilis* were 0.8 g.L^{-1} and 0.6 g.L^{-1} , respectively. In the physicochemical analysis, the product of *S. cerevisiae* presented 80.04% of lipids and 19.64% of carbohydrates in its composition, whereas that of *C. utilis*, $96.43 \pm 0.67\%$ of lipids and 3.21% of carbohydrates, being confirmed their structures through infrared and NMR spectra. In the fatty acid profile the highest percentages were of linoleic acid (50.58%) (*S. cerevisiae*) and oleic acid (68.63%) (*C. utilis*) and emulsions ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC and $2 \times \text{CMC}$) were stable. The thermal analysis showed that both are stable at the application temperature, since they had negligible mass loss in temperature up to 200°C . In addition, biosurfactants are not potentially cytotoxic in lineage cultures of fibroblasts (L929) and macrophages (RAW 264.7) of the mice. By incorporating the biosurfactants into the cookie dough, there were no significant differences in physical and physical-chemical properties after cooking. In the analysis of the texture profile before cooking, the replacement of the yolk by the biosurfactants showed to be significant in all evaluated parameters, with results of firmness,

cohesiveness and elasticity of the product of *S. cerevisiae* closer to the standard formulation. After firing, the firmness was significant only with the replacement of the biosurfactant of *C. utilis*, since this had high lipid content, resulting in a softer and more elastic biscuit. Therefore, biosurfactants present potential of application in the food industry.

Key-words: Bioemulsifiers. Characterization. Emulsification Index. Foods. Superficial tension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura de várias moléculas de surfactantes formando micelas.....	20
Figura 2 – Principais tipos de glicolipídeos.	23
Figura 3 – Tensão superficial e interfacial e solubilização em função da concentração de biossurfactante.	24
Figura 4 – Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos (a) e hidrocarbonetos (b) como substratos.	27
Figura 5 – Função dos emulsificantes: facilitar a formação de emulsões (a) promover sua estabilidade (b).	31
Figura 6 – Linhagem não-cancerígena de fibroblastos de camundongo (L929).	44
Figura 7 – Microplaca com células L929 na concentração 10^5 em meio DMEM.....	44
Figura 8 – CMC dos biossurfactantes produzidos por <i>S. cerevisiae</i> (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina) e <i>C. utilis</i> (6% óleo de fritura de canola e 6% de glicose).	53
Figura 9 – Cromatografia em camada fina dos biossurfactantes produzidos por <i>C. utilis</i> (A) e <i>S. cerevisiae</i> (B) utilizando-se anisaldeído como revelador.....	54
Figura 10 – Espectro de infravermelho do biossurfactante produzido por <i>C. utilis</i> com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose	56
Figura 11 – Espectro de infravermelho do biossurfactante produzido por <i>S. cerevisiae</i> com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina.	57
Figura 12 – Espectro de $^1\text{HRMN}$ registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por <i>C. utilis</i> com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose.	58
Figura 13 – Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por <i>C. utilis</i> com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose.	58
Figura 14 – Espectro de $^1\text{HRMN}$ registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por <i>S. cerevisiae</i> com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina.	59
Figura 15 – Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por <i>S. cerevisiae</i> com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina.	59
Figura 16 – Cromatogramas do perfil de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos por <i>C. utilis</i> (A) e <i>S. cerevisiae</i> (B).	61
Figura 17 – Fotomicrografia de emulsões preparadas com soluções ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2 CMC) de biossurfactante de <i>S. cerevisiae</i> com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina.	63

Figura 18 – Fotomicrografias de emulsões preparadas com soluções ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2 CMC) de biossurfactante de <i>C. utilis</i> com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose.....	63
Figura 19 – TG (azul) e DSC (preto) do biossurfactante produzido por <i>C. utilis</i>	65
Figura 20 – TG (azul) e DSC (preto) do biossurfactante produzido por <i>S. cerevisiae</i>	65
Figura 21 – Capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio para as amostras de biossurfactante de <i>S. cerevisiae</i> (A) e <i>C. utilis</i> (B), da maior concentração (1) para a menor (6).	68
Figura 22 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das amostras de biossurfactante de <i>C. utilis</i> (A) e <i>S. cerevisiae</i> (B) e dos padrões Trolox (C) e BHT(D), da maior concentração (1) para a menor (6).....	68
Figura 23 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro íons superóxido das amostras de biossurfactante de <i>S. cerevisiae</i> (A) e <i>C. utilis</i> (B), da maior concentração (1) para a menor (6).	70
Figura 24 – Atividade antibacteriana do biossurfactante de <i>C. utilis</i> em meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose.	71
Figura 25 – Atividade antibacteriana do biossurfactante de <i>S. cerevisiae</i> em meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina.	72
Figura 26 – Biscoitos antes e após a cocção. (A): formulação padrão; (B): formulação A <i>C. utilis</i> ; (C): formulação B <i>C. utilis</i> ; (D): formulação A <i>S. cerevisiae</i> ; (E): formulação B <i>S. cerevisiae</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes formulações para produção de biossurfactante por <i>S. cerevisiae</i>	36
Tabela 2 – Composição da massa de biscoito tipo <i>cookie</i>	45
Tabela 3 – Tensão superficial e interfacial após o processo de produção dos biossurfactantes.	48
Tabela 4 – Índice de emulsificação após o processo de produção dos biossurfactantes.	50
Tabela 5 – Rendimento e aspecto dos biossurfactantes isolados por cada método de extração.	51
Tabela 6 – Composição físico-química dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras <i>C. utilis</i> (6% óleo de fritura de canola e 6% de glicose) e <i>S. cerevisiae</i> (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina).....	55
Tabela 7 – Perfil de ácidos graxos para os biossurfactantes produzidos por <i>C. utilis</i> (6% óleo de fritura de canola e 6% de glicose) e <i>S. cerevisiae</i> (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina).....	61
Tabela 8 – Percentual de sequestro de radicais DPPH (% I) e da capacidade antioxidante total (% CAT) em diferentes concentrações dos biossurfactantes de <i>C. utilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	67
Tabela 9 – Percentual de sequestro de íons superóxidos (% I) em diferentes concentrações dos biossurfactantes de <i>C. utilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	69
Tabela 10 – Diâmetro (mm) do halo de inibição dos biossurfactantes frente bactérias patogênicas.	71
Tabela 11 – Percentual de inibição dos biossurfactantes de <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. utilis</i> frente as linhagens L929 e RAW 264.7.	73
Tabela 12 – Propriedades físicas dos biscoitos após cocção.	74
Tabela 13 – Composição físico-química e valor energético dos biscoitos com e sem adição de biossurfactantes.	75
Tabela 14 – Análise do perfil de textura dos biscoitos antes e após cocção.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG/FID	Cromatografia Gasosa acoplada à detector por ionização de chama
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilidrazil
DSC	Differential Scanning Calorimetry
E ₂₄	Índice de Emulsificação após 24h
FDA	Food and Drug Administration
GMS	Glycerol Monostearate
GRAS	Generally Regarded As Safe
FT-IR	Fourier-Transform Infrared
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standards
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TLC	Thin Layer Chromatography
TPA	Texture Process Analysis
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
YMA	Yeast Mold Agar
YMB	Yeast Mold Broth
YPD	Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	SURFACTANTES	20
3.2	BIOSURFACTANTES	21
3.2.1	Classificação	22
3.2.2	Propriedades	24
3.3	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	25
3.3.1	Micro-organismos produtores	27
3.3.2	Resíduos industriais como substratos	28
3.4	SEGMENTOS DE APLICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	29
3.4.1	Indústria alimentícia	30
3.4.1.1	Uso dos biosurfactantes na formulação de biscoitos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DOS BIOSURFACTANTES	35
4.1.1	Micro-organismos produtores dos biosurfactantes	35
4.1.2	Meios de manutenção e crescimento	35
4.1.3	Preparação do inóculo	35
4.1.4	Meio de produção	36
4.1.5	Produção dos biosurfactantes	36
4.1.6	Determinação da tensão superficial e interfacial	37
4.1.7	Determinação do Índice de emulsificação	37
4.1.8	Isolamento dos biosurfactantes	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	39

4.2.1	Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	39
4.2.2	Análise qualitativa dos biossurfactantes	39
4.2.3	Composição físico-química dos biossurfactantes	40
4.2.4	Análise estrutural e perfil de ácidos graxos dos biossurfactantes	40
4.2.5	Microscopia de luz das emulsões	41
4.2.6	Calorimetria Exploratória Diferencial e análise termogravimétrica	41
4.2.7	Atividade antioxidante	41
4.2.8	Atividade antibacteriana	43
4.2.9	Avaliação do potencial citotóxico dos biossurfactantes (Teste do MTT)	43
4.3	PREPARO DAS FORMULAÇÕES DOS BISCOITOS TIPO <i>COOKIE</i>	45
4.3.1	Materiais e preparação dos biscoitos	45
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS BISCOITOS	46
4.4.1	Propriedades físicas dos biscoitos assados	46
4.4.2	Análise físico-química e determinação do valor energético dos biscoitos após cocção	46
4.4.3	Análise de textura dos biscoitos com e sem biossurfactante	47
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	AVALIAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS	48
5.1.1	Tensão superficial e interfacial e índice de emulsificação	48
5.1.2	Métodos de extração	51
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	52
5.2.1	Concentração Micelar Crítica (CMC)	52
5.2.2	Análise da composição dos biossurfactantes	53
5.2.2.1	Análise qualitativa	53
5.2.2.2	Análise quantitativa	55
5.2.3	Estrutural	56
5.2.3.1	FIT-IR e Espectrometria de RMN	56

5.2.3.2	Perfil de ácidos graxos por GC/FID	60
5.2.4	Distribuição do tamanho de partículas das emulsões	62
5.2.5	Termoestabilidade	64
5.2.6	Atividade Antioxidante.....	67
5.2.7	Atividade antibacteriana	70
5.2.8	Citotoxicidade	73
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS BISCOITOS TIPO <i>COOKIE</i>.....	74
5.3.1	Propriedades físicas	74
5.3.2	Análise físico-química.....	75
5.3.3	Análise de Textura dos biscoitos.....	76
6	CONCLUSÕES.....	79
7	PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Compostos químicos que possuem a propriedade de preferencialmente se localizarem entre as fases com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio são conhecidos como surfactantes, que podem ser de origem sintética ou natural, sendo estes últimos chamados de biossurfactantes. Estes apresentam moléculas anfipáticas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo a porção polar iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfotérica, e a porção não polar constituída comumente de uma cadeia hidrocarbonada. Estas características favorecem a capacidade dos biossurfactantes de reduzirem as tensões superficiais e interfaciais, bem como formarem microemulsões, nas quais os hidrocarbonetos são solubilizados em água ou vice-versa. Tais propriedades fazem com que os biossurfactantes sejam utilizados em diversos setores industriais que envolvam emulsificação, detergência, lubrificação, molhagem, formação de espuma, dispersões ou solubilização de diferentes fases (SANTOS et al., 2017). Além disso, possuem vantagens em relação aos emulsificantes sintéticos, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, eficácia em diferentes condições ambientais e biocompatibilidade (RIENZO et al., 2015; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017).

Entre as espécies de micro-organismos capazes de produzirem biossurfactantes estão as leveduras *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, as quais têm sido sugeridas em função de seu uso benéfico, pois não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, sendo geralmente reconhecidos como seguros (GRAS – *Generally Regarded As Safe*) (BOURDICHON et al., 2012; CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014). Estes micro-organismos produzem os biossurfactantes a partir de substratos oleaginosos, incluindo até resíduos agroindustriais como glicerol, milhocina e óleo de fritura (RUFINO et al., 2013; SANTOS et al., 2013; CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014; CAMPOS et al., 2015).

Como aplicação, os biossurfactantes estão sendo empregados em diversos setores: cosméticos, sabão, tintas, couro, sistemas de administração de fármacos e alimentos, sendo neste último por apresentarem importância em alimentos constituídos de óleos e gorduras (CAMPOS et al., 2013; SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016; GIRI et al., 2017; RANE et al., 2017).

Ainda no contexto alimentício, os biossurfactantes vêm sendo utilizados na formulação de alimentos para diversos fins, entre eles a melhoria da viscosidade, inibição de crescimento de micro-organismos patogênicos, redução do valor energético em substituição da gordura e melhoria da textura de massa de pães e biscoitos, sem causar efeitos adversos à

saúde humana e animal, uma vez que são de origem natural e apresentam baixa toxicidade quando produzidos por micro-organismos de *status* GRAS. Desta forma, cada vez mais vem se buscando alternativas para favorecer a aplicação de biossurfactantes com o objetivo de substituir compostos sintéticos e prejudiciais (MNIF et al., 2012; BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYYA, 2014; CAMPOS et al., 2015; ZOUARI et al., 2016).

Considerando os relatos da utilização de biossurfactantes no setor alimentício, este trabalho objetivou avaliar a produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes produzidos por leveduras em formulações de biscoitos, avaliando-se o potencial de atividade antioxidante e antibacteriana e a citotoxicidade, bem como seu efeito nas características físicas e físico-químicas e no perfil de textura dos biscoitos obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar e aplicar os biossurfactantes produzidos por *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* como ingrediente em biscoito tipo *cookie* em substituição à gordura animal.

2.2 ESPECÍFICOS

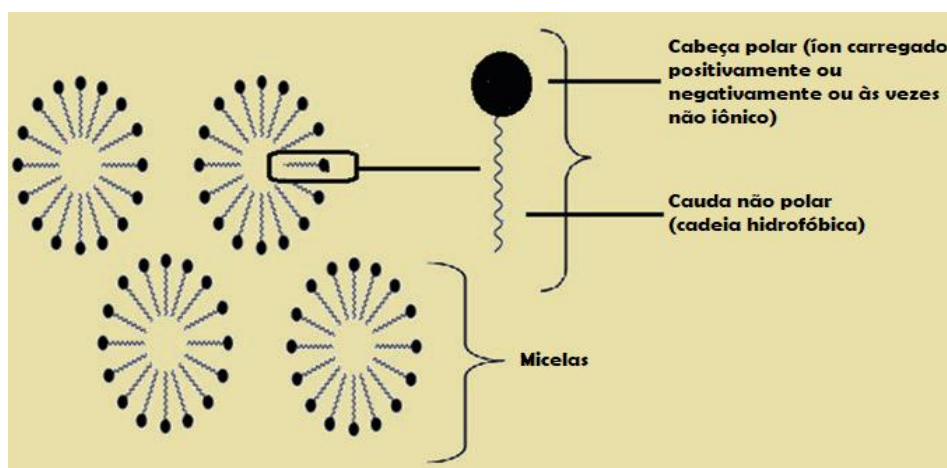
- Produzir e isolar os biossurfactantes produzidos por *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.
- Caracterizar os biossurfactantes produzidos pelas técnicas de RMN, FT-IR, GC/FID e TG/DSC.
- Determinar a atividade antioxidante, antibacteriana e a citotoxicidade dos biossurfactantes isolados.
- Utilizar os biossurfactantes como agentes emulsificantes em substituição parcial e total da gordura animal na formulação de biscoito tipo *cookie*.
- Determinar as propriedades físicas e químicas e analisar a textura e valor energético dos biscoitos obtidos com e sem adição dos biossurfactantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são agentes tensoativos, de natureza anfifílica, que apresentam em sua estrutura uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. Sua aplicação é bastante ampla, devido à capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial de diversos meios por meio da formação de micelas, que se acumulam na interfase entre líquidos de diferentes polaridades como água e óleo (Figura 1) (SOLOMON et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

Figura 1 – Estrutura de várias moléculas de surfactantes formando micelas.



FONTE: SHARMA; OBEROI, 2017

A partir da formação de micelas, aumenta-se a solubilidade e a disponibilidade de compostos orgânicos, apresentando os surfactantes um papel significativo na formação de microemulsões. Estas microemulsões são misturas líquidas claras e estáveis compostas de água e óleo, separadas por monocamadas ou agregados de surfactantes, sendo formadas quando uma fase líquida é dispersa como gotículas em outra fase líquida. Dois exemplos muito comuns de microemulsão ocorrem quando o óleo é disperso em água, chamada de microemulsão direta ou quando a água é dispersa em óleo, sendo considerada uma microemulsão reversa (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011; PERFUMO et al., 2017).

A utilização de surfactantes é relatada desde o ano de 2800 aC, sendo produzidos pela antiga civilização por saponificação de gorduras de animais ou vegetais gerando sabões de sais alcalinos de ácidos graxos. Ao longo dos anos, com o advento da Primeira Guerra Mundial, a produção dos surfactantes por este método foi inviabilizada, em razão da restrição

de produtos de origem animal e vegetal, sendo necessária sua aplicação em larga escala sem sabão, gerando os surfactantes sintéticos. Consequentemente, o mercado destes produtos aumentou expressivamente. Com o crescimento do consumo dos surfactantes sintéticos, houve também um aumento dos efeitos ambientais negativos devido à resistência à degradação que estes surfactantes apresentavam (WILLIAMS; TRINDADE, 2017).

Os surfactantes sintéticos mais utilizados tinham uma estrutura composta de sulfonato de alquilbenzeno (ABS) ramificada, que confere resistência à biodegradação e subsequente acumulação no meio ambiente. Entretanto, a estrutura ramificada foi substituída pela estrutura linear da mesma molécula (LABS), pois se observou que esta é mais favorável à biodegradação, passando a ser mais utilizada voluntariamente e por regulação mundial, sendo no Brasil por meio do decreto nº 79.094, em virtude das más consequências ambientais ocasionadas por ABS. Desta forma, foi possível minimizar o efeito negativo do tensoativo, visto que várias bactérias presentes em plantas e águas residuais apresentaram capacidade para degradar o LABS mais eficazmente que o ABS. Apesar disso, a preocupação com este tipo de surfactante não foi eliminada completamente, já que foi comprovado que os LABS permanecem resistentes sob condições anaeróbicas (BRASIL, 1977; CARRILHO et al., 2016; GUAN et al., 2017).

Neste contexto, a busca para utilização de agentes tensoativos mais sustentáveis e menos agressivos ao meio ambiente resultou em um maior interesse por surfactantes de origem biológica, mais conhecidos como biossurfactantes. Estes compostos são oriundos do metabolismo secundário de micro-organismos, cuja atividade demonstra um desempenho equivalente ao dos surfactantes sintéticos. Apesar dos biossurfactantes serem obtidos por via microbiana, sendo os mais estudados atualmente, já foi detectado e relatado que algumas plantas também apresentam alguns glicolídeos, estrutura comum de um tipo de biossurfactante. Em função do grande potencial dos biossurfactantes, aliado à busca de medidas alternativas para utilização de produtos sustentáveis, o interesse na pesquisa destes compostos aumentou consideravelmente nos últimos anos (NAJMI et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

3.2 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes também são definidos como um grupo de moléculas que possui uma superfície ativa e, assim como os surfactantes sintéticos, são capazes de reduzir a tensão interfacial entre as fases água-ar, água-óleo e água-sólido. Em sua estrutura há uma

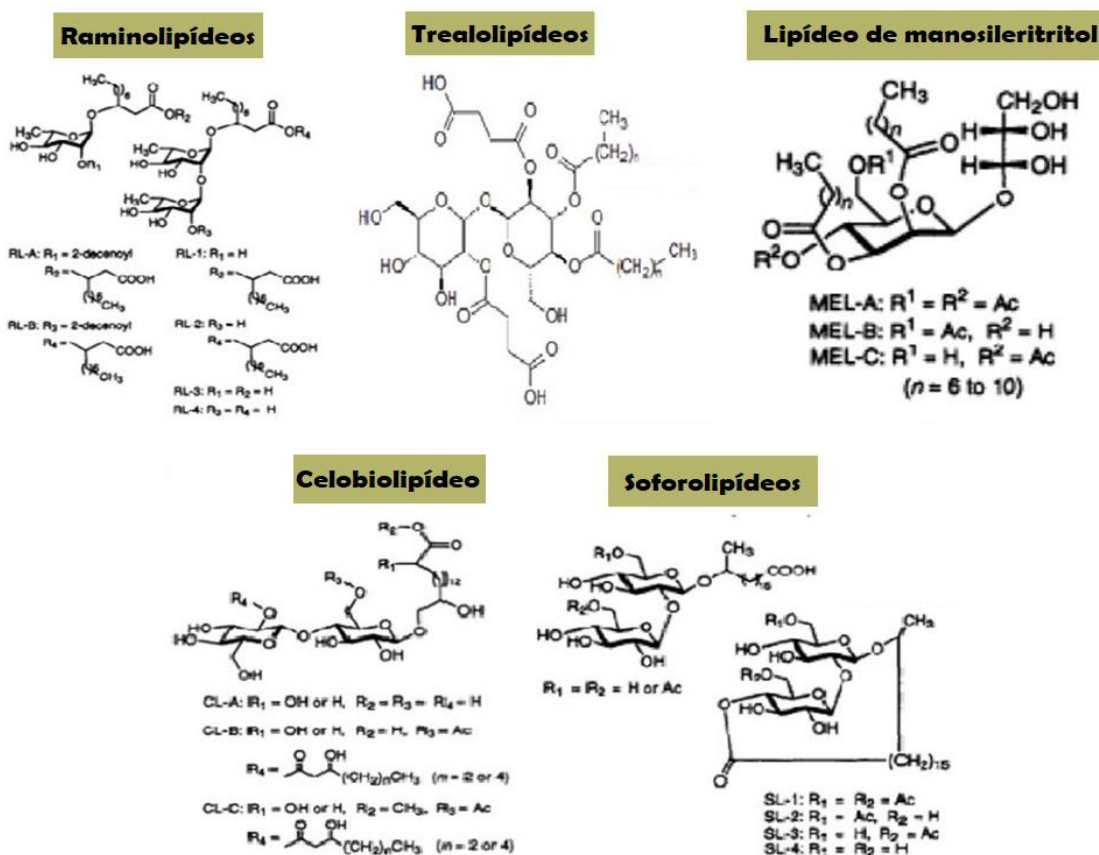
porção hidrofílica (carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, grupo fosfato, ácido carboxílico, álcool, entre outros) e uma hidrofóbica (ácido graxo de cadeia longa, ácido graxo hidroxílico ou ácido graxo α -alquil- β -hidroxi) sendo, desta forma, considerado anfifílico. Uma vez que a maioria dos biossurfactantes pode ser produzida por uma gama de micro-organismos, existem diversos tipos, identificados principalmente conforme a sua estrutura química (SHARMA; SAHARAN, 2016; SOUZA et al., 2017; GIRI et al., 2017).

3.2.1 Classificação

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com diferentes critérios: peso molecular (alto e baixo), cargas iônicas (aniônicos, catiônicos, não iônicos e neutros) e tipo de secreção (intracelular, extracelular e aderente a células microbianas). Entretanto, para os surfactantes oriundos de micro-organismos, o principal critério de classificação é o tipo de estrutura química apresentada, sendo os mais comuns os lipopolissacarídeos, lipoproteínas e biopolímeros complexos (alto peso molecular), e os fosfolípídeos, lipopeptídeos e glicolípídeos, (baixo peso molecular). Dentre estes, os glicolípídeos são o grupo de biossurfactantes mais estudados por diversos autores, devido à alta produção e aplicações potenciais (MNIF; ELLOUZ-CHAABOUNI; GHRIBI, 2017; SOUZA et al., 2017).

Segundo Williams e Trindade (2017), os glicolípídeos são compostos de ácidos graxos combinados com carboidratos por meio de ligações glicosídicas. Eles são subdivididos em vários tipos, de acordo com o carboidrato presente na estrutura, sendo os mais conhecidos os raminolípídeos, trealolípídeos, lipídeos de manosileritritol (MEL), celobiolípídeos e soforolípídeos (Figura 2). Esta subdivisão ocorre conforme a natureza da fração de carboidratos e lipídeos na molécula, sendo os raminolípídeos comumente oriundos de *Pseudomonas* sp., trealolípídeos de *Rhodococcus* e outras espécies bacterianas, lipídeos de manosileritritol por *Pseudozyma* sp. e os soforolípídeos produzidos principalmente por leveduras, em especial as do gênero *Candida*.

Figura 2 – Principais tipos de glicolipídeos.



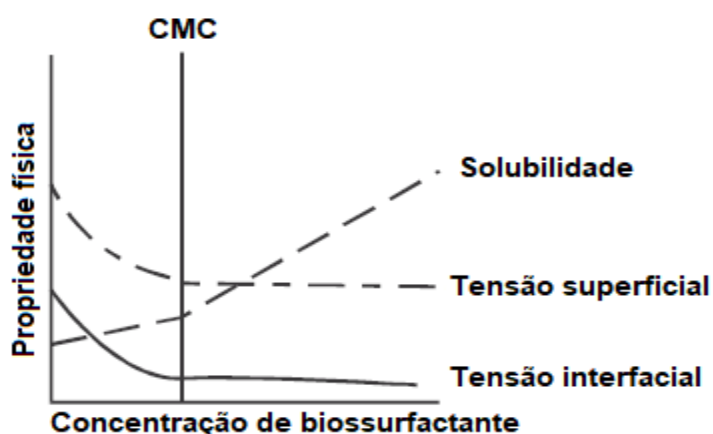
FONTE: MNIF; ELLOUZ-CHAABOUNI; GHRIBI, 2017

A estrutura dos soforolipídeos possui uma molécula de soforose ligada a um ácido graxo hidroxílico de cadeia longa através de uma ligação glicosídica. Os treololipídeos são constituídos de ácido micólico (ácido β -hidroxicarboxílico de cadeia longa) ligado ao dissacarídeo trealose, sendo produzidos também pelas espécies bacterianas *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium* (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010). Os lípidios de Manosileritritol (MEL) são constituídos do açúcar manose, ligados a cadeia de ácido graxo, os quais podem diferir em relação ao comprimento da cadeia hidrofóbica, grau de saturação e/ou acetilação nas posições C₄ e C₆ do açúcar. Já os raminolipídeos, como o próprio nome diz, são constituídos de unidades de raminose ligadas a unidades de ácido graxo 3-hidroxila via ligação β -glicosídica. As unidades de raminose estão ligadas entre si por ligações O-glicosídicas, enquanto que os ácidos graxos estão unidos por ligações do tipo éster (IROPHERE et al., 2017; PERFUMO et al., 2017).

3.2.2 Propriedades

Uma das funções mais relevantes de um biossurfactante consiste na capacidade de este reduzir a tensão superficial de um sistema, sendo a redução proporcional à sua concentração no meio. Este fenômeno ocorre a partir da formação de micelas, constituídas de moléculas anfipáticas agregadas às porções hidrofílicas (na região externa da molécula) e às porções hidrofóbicas (região interna). A tensão superficial de um sistema diminui à medida que as micelas são formadas, e sua concentração está relacionada à Concentração Micelar Crítica (CMC), correspondente à mínima concentração de surfactante ou biossurfactante necessária para que a tensão superficial e interfacial seja reduzida ao máximo (Figura 3). Um bom biossurfactante deve apresentar tanto eficiência, medida pela CMC, como efetividade, associada às tensões superficiais e interfaciais (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016). Os biossurfactantes que possuem baixo peso molecular apresentam-se mais eficientes na redução da tensão tanto superficial quanto interfacial. Já as estruturas que apresentam peso molecular alto são mais eficazes e eficientes na estabilização de emulsões óleo-água, reduzindo as forças repulsivas e, assim, permitindo mais facilmente a mistura e interação entre as duas fases (FARIQ; SAEED, 2016; SOLOMON et al., 2017).

Figura 3 – Tensão superficial e interfacial e solubilização em função da concentração de biossurfactante



FONTE: MULLIGAN; GIBBS, 2004

Além das características já apresentadas, os tensoativos microbianos apresentam inúmeras propriedades e funções fisiológicas, desempenhando um papel relevante, em especial, na solubilização de compostos hidrofóbicos, na ligação de metais pesados, na adesão e agregação celular e na produção de compostos antimicrobianos e antibióticos. Os

biossurfactantes também apresentam outras propriedades interessantes, como ação antimicrobiana, hemolítica, antiviral, anticancerígena e imuno-moduladora, sendo passíveis de utilização na biomedicina e terapêutica (MNIF; GHRIBI, 2016). Estas propriedades tornam os biossurfactantes uma alternativa segura para combater diversos agentes patogênicos que são transmitidos pelos alimentos (SHARMA; SAHARAN, 2016; EKPENYONG et al., 2017).

Ademais, possuem várias vantagens sobre os agentes tensoativos químicos, uma vez que podem ser produzidos a partir de substratos agroindustriais e apresentam baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente, bem como maior seletividade, capacidade de formar espumas e estabilidade frente condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Desta forma, apresenta grande potencial para uso no aumento da solubilidade e biodegradação de hidrocarbonetos (MADDIKERI; GOGATE; PANDIT, 2015; GIRI et al., 2017; BAKHSHI; SOLEIMANIAN-ZADA; SHEIKH-ZEINODDIN, 2017).

3.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

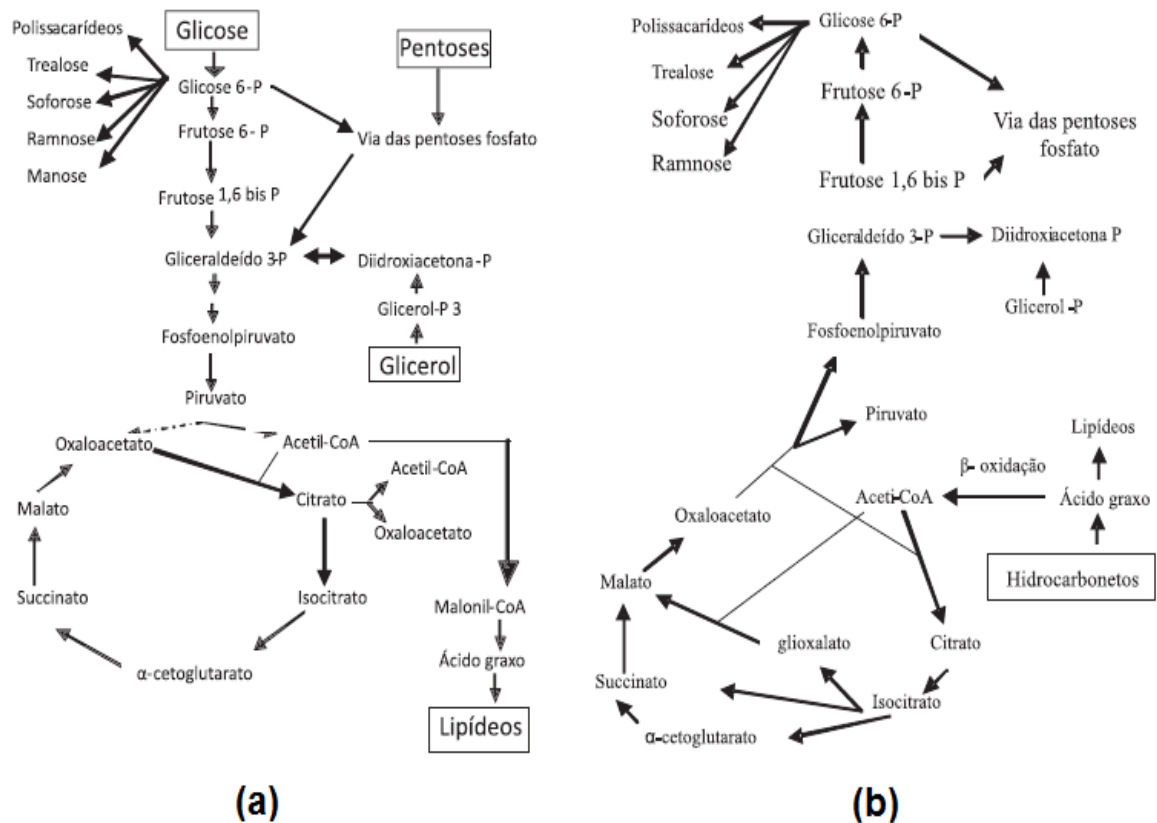
Recentemente, a utilização mais extensiva dos biossurfactantes tem passado por alguns obstáculos como a desvantagem econômica de sua produção, uma vez que o custo de mercado ainda é elevado quando comparado à produção de surfactantes químicos. Para produção de um biossurfactante, o custo apenas com a matéria-prima representa cerca de 10 a 30% do custo total, e a disponibilidade de um método adequado de produção e recuperação econômica, associada a um bom rendimento e produtividade do micro-organismo produtor ainda não foi bem estabelecida (RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017).

Diversos micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, podem sintetizar biossurfactantes. Estes micro-organismos devem possuir a capacidade de crescer tanto em substratos imiscíveis em água, como óleos vegetais e hidrocarbonetos, quanto em compostos solúveis em água, tais como carboidratos e glicerol. Sua produção e composição geralmente estão condicionadas às condições de cultivo e composição do meio, pois são importantes para a sobrevivência de seus micro-organismos produtores, contribuindo para o aumento da solubilidade de compostos insolúveis em água e, por sua vez, facilitando o seu transporte para a célula (SOUZA et al., 2017). Entretanto, nem sempre a sua obtenção é conduzida por meio de vias biossintéticas principais, sendo necessária a utilização de substratos insolúveis em água para induzirem a formação destes metabólitos secundários, como, por exemplo, óleos, gorduras e/ou hidrocarbonetos sólidos e líquidos (VAN-HAMME; SINGH; WARD, 2006; CAMPOS et al., 2013; CAMPOS, 2015).

Diversos autores relatam a influência da fonte de carbono para produção dos biossurfactantes, sendo possível utilizarem vários substratos distintos, gerando biossurfactantes com diferentes estruturas e propriedades. Assim, as condições para obtenção de certas características são determinantes para o tipo de aplicação desejada. A síntese dos surfactantes microbianos é geralmente dividida em síntese “de novo” ou substrato dependente de carbono, podendo seguir por várias vias distintas. Entretanto, os biossurfactantes também podem ser produzidos por micro-organismos sob condições ótimas de crescimento (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014). Além do tipo de fonte de carbono, cada micro-organismo utilizado também determina a estrutura do biossurfactante produzido, sendo a maioria formada geralmente por uma estrutura de manoproteína ou glicolipídica, ou um complexo de carboidrato-lipídeo-proteína. Ademais, são resultantes de altas taxas de conversão de substrato e apresentam alta produtividade (CAMPOS et al., 2013; CAMPOS, 2015; ELSHAFIE et al., 2015).

A síntese da porção polar dos biossurfactantes é resultante da utilização pelos micro-organismos tanto do substrato hidrofílico, após ser metabolizado primeiramente para obtenção de energia pela via glicolítica, quanto pela via da gliconeogênese, quando utilizado um substrato hidrofóbico. Já a fração apolar é obtida tanto a partir de um substrato hidrofílico, por meio da oxidação da glicose a piruvato e em seguida conversão a acetil-CoA, precursor da síntese de ácidos graxos, como a partir da via lipolítica, quando substratos hidrofóbicos estão presentes no meio (Figura 4). Também são apresentados estudos em que é utilizado no mesmo meio de produção um substrato solúvel em água e outro insolúvel (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Figura 4 – Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos **(a)** e hidrocarbonetos **(b)** como substratos



FONTE: FONTES; AMARAL; COELHO, 2008

3.3.1 Micro-organismos produtores

Apesar das bactérias serem bastante relatadas na literatura para produção de biossurfactantes, sua utilização em alguns setores é restrita, uma vez que algumas delas apresentam características patogênicas, além de produzirem biossurfactantes em concentrações mais baixas que as leveduras (SHARMA; SAHARAN, 2016; SOLOMON et al., 2017). Desta forma, as leveduras têm apresentado grande potencial para utilização, visto que industrialmente são extremamente empregadas. Além disso, uma grande vantagem do uso de algumas leveduras consiste no fato de serem incluídas no *status* GRAS (em inglês, *Generally Regarded As Safe* – geralmente reconhecido como seguro), pois não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo, por exemplo, sua utilização na indústria de alimentos. Algumas leveduras incluídas neste *status* são: *Candida lipolytica*, *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* (CAMPOS, 2015; ELSHAFIE et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Várias leveduras do gênero *Candida* são relatadas por diversos autores para produção de biossurfactantes, sendo capazes de incorporar ácidos graxos diretamente, tais como:

Candida bombicola (LUNA et al., 2016), *Candida glabrata* (LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2009; GUSMÃO; RUFINO; SARUBBO, 2010), *Candida lipolytica* (RUFINO et al., 2014; SANTOS et al., 2016), *Candida sphaerica* (CHAPRÃO et al., 2015; LUNA et al., 2015), *Candida utilis* (CAMPOS et al., 2013) e *Candida tropicalis* (ALMEIDA et al., 2017). As leveduras deste gênero têm sido cada vez mais estudadas para este fim, uma vez que cada espécie apresenta capacidade de produzir um biossurfactante pertencente a um dos principais grupos de surfactantes microbianos. Dentre as espécies deste gênero, a levedura *Candida utilis* apresenta potencial como micro-organismo produtor de compostos com atividade de emulsificação e atividade surfactante (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014; CAMPOS et al., 2015; CAMPOS, 2015). Isto se deve ao fato de seu biossurfactante produzido apresentar baixos valores de tensão superficial e bom índice de emulsificação frente outros micro-organismos analisados nas mesmas condições, como *Candida lipolytica* (UCP 0988) (SANTOS et al., 2017), *Candida tropicalis* (UCP 0996) (ALMEIDA et al., 2017) e *Candida guilliermondii* (LUNA et al., 2016).

Biossurfactantes produzidos por leveduras do gênero *Saccharomyces* também são descritos na literatura, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a mais comumente empregada, com rendimentos relatados em torno de 10 g.L⁻¹ (JOHNY, 2013; BHATIA; SAHARAN, 2015; SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016). Sua utilização tem sido ampla, pois seu metabólito é conhecido por apresentar propriedade emulsificante eficaz. Uma vez que este micro-organismo é bastante utilizado em produtos alimentícios, bebidas e cosméticos, seu emulsificante produzido apresenta características atóxicas. Além de tudo, seu percentual de recuperação é maior, comparado com os valores de rendimento de emulsificantes derivados de outras leveduras (BARRIGA, 1999; SRIDHAR et al., 2015; SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016).

3.3.2 Resíduos industriais como substratos

A seleção do substrato depende da escolha da matéria-prima com adequado balanço de nutrientes para crescimento e produção, sendo necessário conter elevado teor de carboidratos e lipídios, elementos essenciais para a produção de biossurfactantes. Entretanto, os custos com a utilização destes substratos são elevados e dificultam a aplicação dos biossurfactantes em escala comercial (SANTOS et al., 2016). Segundo Campos, Stamford e Sarubbo (2014), o emprego de resíduos industriais como matéria-prima em bioprocessos é recomendado, desde que haja um bom equilíbrio de nutrientes para obtenção do produto desejado. Desta forma, a

produção de biossurfactantes que antes era considerada economicamente inviável, passa a ser implementada com potencial viabilidade por meio da utilização de diversos resíduos.

Neste contexto, novas perspectivas de produção com menor custo vêm sendo levantadas nos processos biotecnológicos visando à formulação de meios alternativos, compostos de resíduos agroindustriais nos processos de produção de metabólitos secundários, uma vez que estes respondem por cerca de 50% do custo final do produto. (RUFINO et al., 2014; SANTOS et al., 2016; LIMA et al., 2017). Considerando-se que o Brasil é um país essencialmente agrícola, os subprodutos agroindustriais são gerados constantemente, com facilidade de acesso bastante significativa. Sendo assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a utilização destes substratos, com o objetivo de aumentar a viabilidade de produção em larga escala dos biossurfactantes, além de aumentar a sua competitividade (SARUBBO et al., 2015).

Dentre os subprodutos industriais amplamente produzidos destacam-se o glicerol (obtido com a produção do biodiesel) (SILVA et al., 2010), suco de maçã de caju clarificado (OLIVEIRA; GARCÍA-CRUZ, 2013), vinhaça (OLIVEIRA et al., 2013), águas residuais de mandioca (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008), resíduo de refinaria de óleo de castanha (SOBRINHO et al., 2008), gordura animal (SANTOS et al., 2013) gordura vegetal (GUSMÃO; RUFINO; SARUBBO, 2010), resíduo de refinaria de óleo de soja (LUNA et al., 2011), óleo de fritura de canola (CAMPOS, STAMFORD; SARUBBO, 2014), melaço de cana de açúcar (SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2017) e licor de milho, conhecido como milhocina (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2017). De acordo com a literatura, a utilização destes subprodutos demonstrou bons resultados para a produção de biossurfactantes por micro-organismos. Estes resíduos podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, substituindo matérias-primas de maior valor agregado. Sendo assim, os biossurfactantes produzidos a partir de resíduos apresentam-se promissores em relação à sua utilização como matéria-prima nos setores de alimentos, cosméticos, agroquímicos e farmacêuticos (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

3.4 SEGMENTOS DE APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Uma vez que os biossurfactantes apresentam vantagens explícitas frente aos seus homólogos químicos, eles vêm sendo cada vez mais estudados para futuras aplicações. De acordo com vários autores, eles podem ser empregados em diversos segmentos, substituindo, pelo menos parcialmente, os surfactantes químicos em produtos de grande consumo. Dentre

estes produtos se destacam os detergentes para lavagem de roupas, produtos para limpeza de superfícies e de higiene pessoal e cosméticos (RIENZO et al., 2015; PERFUMO et al. 2017; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017).

Aplicações mais específicas também vêm ganhando mais atenção, já que é possível explorar seu potencial sinérgico quando em associação com antibióticos e moléculas bioativas, sendo também empregado no setor farmacêutico. Além disso, os biossurfactantes também podem ser utilizados como agentes antimicrobianos e anti-cancerígenos devido à sua bioatividade (RIENZO et al., 2016). Na agricultura, são utilizados para inibir a ação de certos fungos fitopatogênicos, flores de algas e larvas de insetos, uma vez que este setor tem sofrido com as atividades destrutivas de várias pragas, tais como fungos, ervas daninhas e insetos, levando a uma diminuição drástica nos rendimentos (MNIF; GHRIBI, 2016).

Além das áreas mais comuns, os biossurfactantes também estão sendo empregados em muitos campos não convencionais. Desta forma, contribuem, por exemplo, como agentes redutores e estabilizadores na síntese de nanopartículas, na redução do impacto ambiental durante a extração e remediação de poluentes insolúveis em água, aumentando a recuperação de óleo, bem como na substituição de surfactantes sintéticos tradicionais em tintas e no setor de beneficiamento de couro (SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016; GIRI et al., 2017; RANE et al., 2017).

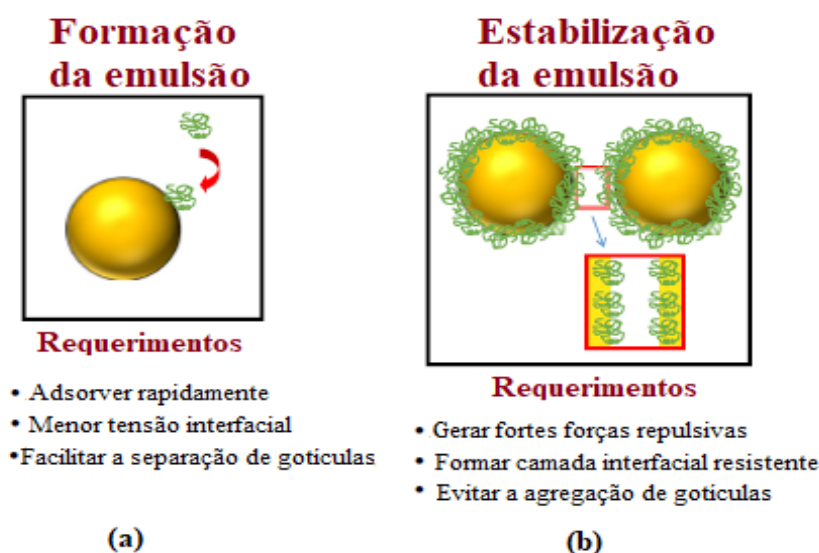
Outro setor promissor para a aplicação de biossurfactantes é o de produtos alimentícios, devido à sua atividade antiadesiva e ampla capacidade de atuar como agente emulsificante, indispensável na maioria dos alimentos contendo óleos e gorduras. Sendo assim, sua utilização tem o mesmo intuito que os emulsificantes já utilizados atualmente: formar emulsões estáveis e melhorar a textura e a cremosidade dos produtos (CAMPOS et al., 2013; MNIF; GHRIBI, 2016; GIRI et al., 2017).

3.4.1 Indústria alimentícia

Na indústria de alimentos, em que são utilizadas proteínas, carboidratos, gorduras e lipídeos, são realizadas diversas combinações, resultando em diferentes tipos de emulsões (pequenas gotículas lipídicas dispersas dentro de um meio aquoso). Estas são de difícil estabilização devido ao grande número de microestruturas complexas, sendo necessária a utilização de alguns aditivos como os emulsificantes, especialmente em sistemas óleo-água (CAMPOS et al., 2016).

Segundo McClements e Gumus (2017), os emulsificantes apresentam um papel decisivo na formação de emulsões bem sucedidas, desempenhando dois papéis fundamentais: (a) facilitar a formação inicial de gotículas lipídicas finas durante a homogeneização e (b) aumentar a estabilidade das gotículas lipídicas, após serem formadas (Figura 5). Assim, é possível controlar o agrupamento de glóbulos e sistemas aerodinâmicos, promovendo a estabilização das fases em sistemas heterogêneos, muito comuns no setor alimentício. Além disso, com sua utilização, aumenta-se suficientemente a vida de prateleira dos produtos, bem como minimiza a separação das fases sem adição de aditivos sintéticos.

Figura 5 – Função dos emulsificantes: facilitar a formação de emulsões **(a)** promover sua estabilidade **(b)**



FONTE: McCLEMENTS; GUMUS, 2017

Neste âmbito, compostos sintéticos, como Tweens e Spans e emulsificantes de origem animal como gelatina ou proteína de ovo ou soro, são utilizados como agentes emulsificantes. No entanto, a demanda por produtos mais naturais foi crescendo ao longo dos anos, resultando em novas formulações a partir de vegetais, como a lecitina de soja e a goma arábica, as quais apresentam atualmente vasta aplicação e aceitação comercial. Entretanto, existem algumas limitações com o uso destes emulsificantes frente às condições de cocção em micro-ondas e irradiação, aumentando-se o interesse em produzir, isolar e identificar novos emulsificantes (NITSCHKE; COSTA, 2007; McCLEMENTS; GUMUS, 2017).

Desta forma, novos aditivos com propriedades espessantes e estabilizantes semelhantes aos aditivos utilizados comercialmente vêm sendo altamente estudados e produzidos. Além disso, a busca por estes novos produtos reduz a dependência e utilização

dos emulsificantes vegetais oriundos, na maioria das vezes, de plantas geneticamente modificadas, como a soja. Neste contexto, os biossurfactantes apresentam-se como melhor alternativa, uma vez que são de origem microbiana e apresentam maior resistência às condições adversas, comumente encontradas em processamento de alimentos (CAMPOS et al., 2013; CAMPOS et al., 2015).

Estes agentes tensoativos apresentam a capacidade de diminuir a energia superficial entre as fases e formar barreiras estereostáticas e eletrostáticas, impedindo a coalescência das partículas. Entretanto, na indústria alimentícia, os aditivos para emulsificação e dispersão não necessitam necessariamente da capacidade de reduzir a tensão superficial da água ou dos hidrocarbonetos, desde que atuem como bons emulsificantes (CAMPOS et al., 2013).

Os biossurfactantes constituídos de glicolípídeos geralmente atuam como bons emulsificantes em sistemas óleo-água, apesar de apresentarem peso molecular baixo. Alguns autores já utilizaram os surfactantes microbianos em alguns alimentos como maioneses, molhos e alimentos funcionais, atuando como agentes emulsificantes eficazes, melhorando a consistência e textura (CAMPOS et al., 2015; McCLEMENTS; GUMUS, 2017). Os biossurfactantes também podem ser utilizados para aumentar a vida útil dos produtos, devido às suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. Além disso, apresentam-se eficazes na solubilização de óleos vegetais e aromas, na estabilização de gorduras durante o processo de cocção, e até mesmo na melhoria das propriedades organolépticas em pães e formulações de sorvetes (KIELISZEK et al., 2017).

Estudos dos últimos 10 anos relatam que melhorias na massa, textura, volume e conservação de produtos de panificação foram comprovados com a adição de surfactantes raminolipídicos. Além disso, também foram observadas melhorias na viscosidade em produtos alimentícios utilizando-se um bioemulsificante isolado de *Enterobacter cloacae*, bem como eficiente emulsificação da gordura em produtos derivados de carne, facilidade na solubilização de aromas e estabilidade de molhos prontos para saladas, sendo este último utilizando-se biossurfactante produzido pela levedura *Candida utilis* (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014; CAMPOS et al., 2015; GIRI et al., 2017).

Outros produtos alimentícios que também apresentam potencial para adição de biossurfactantes em sua formulação, com melhoria do perfil de textura da massa e diminuição do valor energético, são as sobremesas farináceas, como bolos tipo *Muffin* e biscoitos. Nestes alimentos, o emprego dos emulsificantes de origem microbiana surgiu com o intuito de reduzir a utilização dos emulsificantes atualmente comercializados e melhorar a reologia dos produtos, mesmo apresentando atualmente poucos relatos de sua utilização para este fim,

apesar de ter uma diversidade de aplicações (ZAHN, PEPKE; ROHM, 2010; ZOUARI et al., 2016).

3.4.1.1 Uso dos biossurfactantes na formulação de biscoitos

De acordo com a resolução nº 263, de 22 de setembro de 2005 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), “biscoitos ou bolachas são os produtos obtidos pela mistura de farinha(s), amido(s) e/ou fécula(s) com outros ingredientes, submetidos a processos de amassamento e cocção, fermentados ou não. Podem apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos” (BRASIL, 2005).

Os biscoitos são considerados como alimentos simples, “prontos para comer” e, nos últimos anos, assim como outros alimentos de mesma classificação, foram ganhando mais importância para consumo, principalmente por serem caracterizados por uma longa vida útil. Desta forma, apresentam-se como alimentos-alvo para novas formulações mais saudáveis, fornecendo necessidades dietéticas especiais, associado à demanda dos consumidores. Outro aspecto relevante em biscoitos com melhor valor nutricional consiste na preservação de suas propriedades sensoriais (ZAHN, PEPKE; ROHM, 2010; OLIVEIRA et al., 2016).

Independentemente do tipo de biscoito, em sua formulação há sempre os mesmos ingredientes principais, tais como: farinha, açúcar e gordura. Recentemente, entretanto, têm sido estudada a adição de outras matérias-primas e aditivos de maior valor nutritivo e/ou menor valor energético, como concentrados de proteína de soja em biscoitos isentos de glúten, fibras solúveis (β -glucano) de cevada em biscoitos de chocolate e polipeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* em biscoitos de farinha de trigo e gergelim vêm sendo adicionados na formulação para a melhoria das propriedades do produto final (FROST; ADHIKARI; LEWIS, 2011; SARABHAI et al., 2014; ZOUARI et al., 2016).

Neste cenário, os biossurfactantes também podem ser adicionados à formulação de biscoitos, já que, dentre todas as propriedades já destacadas, por serem de origem natural, ainda possuem atividade antioxidante sem efeitos colaterais observados (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYYA, 2014). Em trabalhos recentes, foi mostrado que a suplementação em pão com bioemulsificantes produzidos por *Bacillus subtilis* melhorou significativamente o seu perfil de textura e reduziu a sensibilidade à proliferação microbiana. Além disso, a adição deste mesmo bioemulsificante na formulação de biscoitos de farinha de gergelim, comparado com o emulsificante comercial monoestearato de glicerol (GMS), apresentou perfil de textura da massa mais eficaz. Assim, os

biossurfactantes vêm ganhando mais espaço neste âmbito (MNIF et al., 2012; ZOUARI et al., 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DOS BIOSSURFACTANTES

4.1.1 Micro-organismos produtores dos biossurfactantes

As leveduras *Candida utilis* UFPEDA 1009 e *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670, depositadas, respectivamente, no Banco de Culturas do Departamento de Antibióticos e na Coleção de Culturas do Departamento de Micologia, ambas pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), foram utilizadas na produção dos biossurfactantes.

4.1.2 Meios de manutenção e crescimento

A manutenção das leveduras foi realizada utilizando-se o meio Yeast Mold Agar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura (0,30 %), extrato de malte (0,30 %), D-glicose (1,00 %), triptona (0,50 %) e Agar (2,00 %), dissolvidos em água destilada (100 mL), pH=7,0. Para o crescimento do inóculo, o meio Yeast Mold Broth (YMB), de mesma composição do meio YMA, com exceção do Agar, foi utilizado para *C. utilis*, conforme descrito por Campos, Stamford e Sarubbo (2014) e o meio YPD (1,00 % de extrato de levedura, 2,00 % de D-glicose, e 2,00 % de peptona) para *S. cerevisiae* (SELVAKUMAR, ANIBABIYANS; MADHAN, 2016), sendo todos os componentes solubilizados em água destilada e os meios esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

4.1.3 Preparação do inóculo

O inóculo de *C. utilis* e de *S. cerevisiae* foi padronizado e as culturas foram transferidas para tubos contendo o meio YMA, a fim de se obter culturas jovens. Em seguida, os inóculos de *C. utilis* e *S. cerevisiae* foram transferidos para frascos contendo 50 mL dos meios YMB e YPD, respectivamente, sendo incubados a 28 °C durante 24 horas, sob agitação de 200 rpm. Após este período, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer.

4.1.4 Meio de produção

Para produção do biossurfactante pela levedura *C. utilis* foi preparado um meio mineral contendo (m/v): 0,20 % de NH_4NO_3 , 0,01 % de KH_2PO_4 , 0,50 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 % de FeCl_3 , 0,01 % de NaCl e 0,30 % de extrato de levedura, com adição de 6,00 % de óleo de fritura de canola e 6,00 % de glicose, sendo o pH final ajustado para 5,7 e o meio esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014).

Para a produção do biossurfactante pela levedura *S. cerevisiae*, diferentes meios foram formulados, realizando-se combinações a partir do meio 1, utilizado por Selvakumar, Anibabiyans e Madhan (2016) (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferentes formulações para produção de biossurfactante por *S. cerevisiae*

Meio	Óleo de oliva	Óleo de fritura	NH_4NO_3	Milhocina	Presença dos minerais
1	1,00 %	---	1,00 %	---	Sim
2	---	1,00 %	1,00 %	---	Sim
3	1,00 %	---	---	1,00 %	Sim
4	---	1,00 %	---	1,00 %	Sim
5	1,00 %	---	---	1,00 %	Não
6	---	1,00 %	---	1,00 %	Não

FONTE: Próprio autor

Aos meios 1, 2, 3 e 4 foram adicionados os minerais: 0,40 % NaNO_3 , 0,10 % NaCl , 0,10 % KCl , 0,01 % CaCl_2 , 0,30 % KH_2PO_4 , 0,30 % Na_2HPO_4 , 0,02 % MgSO_4 , 0,10 % FeSO_4 , 0,08 % CoCl_2 , 0,07 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,07 % MnSO_4 , 0,001 % H_3BO_3 , 0,07 % $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ e 0,07 % ZnSO_4 (SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016). Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e o pH final dos meios ajustado para 6,8, sendo em seguida esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

4.1.5 Produção dos biossurfactantes

Para a produção dos biossurfactantes, foram preparados 500 mL de cada meio de cultura em frascos de Erlenmeyers de 1000 mL de capacidade, sendo adicionado em seguida, em meios distintos, 2,0 % (v/v) dos inóculos, na concentração de 10^8 células.mL⁻¹ (conforme contagem em câmara de Neubauer). Após adição dos inóculos, os meios foram mantidos sob

agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 28 °C, permanecendo por 88 horas o meio contendo o inóculo de *C. utilis* (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014) e por 120 horas os meios contendo o inóculo de *S. cerevisiae*. Após o período de incubação, os meios foram submetidos à centrifugação sob agitação de 3500 rpm durante 20 minutos para obtenção do líquido metabólico (livre de biomassa) (SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016).

4.1.6 Determinação da tensão superficial e interfacial

A tensão superficial dos biossurfactantes foi medida no líquido metabólico com auxílio de um tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NOUY. Já a tensão interfacial foi medida frente o n-hexadecano no líquido metabólico (após filtração com membrana filtrante de 0,45 µm de diâmetro).

4.1.7 Determinação do Índice de emulsificação

O líquido metabólico produzido por cada micro-organismo também foi utilizado para determinação do índice de emulsificação, conforme descrito por Prasanna, Bell e Grandison (2012), frente os óleos de milho, soja, canola, girassol e motor. Em síntese, foram adicionados, individualmente, 2,0 mL de cada óleo à 2,0 mL do líquido metabólico, sendo homogeneizado em agitador de tubos vortex durante 2,0 minutos, sob frequência de 50 Hz. Após 24 horas, o índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado de acordo com a Equação 1:

$$E_{24} = (he/ht) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

em que: *he* corresponde à altura da camada de emulsão e *ht* à altura total da mistura (mm). Todas as amostras foram armazenadas sob uma temperatura de aproximadamente 25 a 28 °C (HAN et al., 2015).

Os líquidos metabólicos produzidos por *C. utilis* e *S. cerevisiae* que apresentaram melhores resultados nos ensaios de tensão superficial e interfacial e E_{24} , foram utilizados nos ensaios subsequentes.

4.1.8 Isolamento dos biossurfactantes

Foram testados seis diferentes métodos de extração para o isolamento do biossurfactante produzido por *C. Utilis* e *S. cerevisiae*, sendo um dos métodos desenvolvido em laboratório e os outros descritos por Johny (2013), Bhatia e Saharan (2015), Shah et al. (2017), Derguine-Mecheri et al. (2018), Cameron et al. (1988) (apenas para o biossurfactante de *C. utilis*) e Selvakumar, Anibabiyans e Madhan (2016) (apenas para o biossurfactante de *S. cerevisiae*). Para este fim, foram utilizados 100 mL de meio de cultivo em cada método estudado, sendo para o biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* com o meio que apresentou melhor resultado de tensão superficial e interfacial e índice de emulsificação após 24 horas (E_{24}).

O método desenvolvido em laboratório consistiu primeiramente na extração líquido-líquido com acetato de etila, por duas vezes, na proporção 1:4 com o meio não centrifugado. Em seguida, a fase orgânica foi submetida à centrifugação (2600xg por 20 minutos) e posterior filtração. O filtrado foi transferido novamente para o funil de separação e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) foi adicionada para separar a fase aquosa restante. A fase orgânica foi transferida para um frasco de erlenmeyer e foi adicionado sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) até a formação de grânulos, sendo filtrada em papel de filtro qualitativo e seca à temperatura de 50 °C.

Para execução do método de Johny (2013), o pH do líquido metabólico foi inicialmente ajustado para 2 com solução de ácido clorídrico (HCl) 2 mol.L⁻¹ e submetido à refrigeração (0 °C) durante a noite para precipitação do biossurfactante. Após este período, foi adicionado igual volume de acetona e incubado pelo mesmo período sob temperatura de 40 °C. Para obtenção do biossurfactante bruto, a mistura foi submetida à centrifugação (3500 rpm por 20 minutos), sendo a massa do biossurfactante quantificada a partir da diferença entre o peso do tubo após centrifugação e o peso do tubo vazio.

Seguindo o método descrito por Bhatia e Saharan (2015), ao líquido metabólico foi adicionado igual volume de acetato de etila, agitando-se vigorosamente, sendo posteriormente separada a fase orgânica para evaporação do solvente (60 °C) e obtenção do biossurfactante bruto. Conforme o método de Shah et al. (2017), o meio não foi submetido à centrifugação, sendo realizada a extração com acetato de etila por duas vezes, na proporção 1:1, seguida de secagem da fase orgânica (40 °C), lavagem dos resíduos com hexano (2 vezes) e secagem (40 °C) do biossurfactante bruto.

O método apresentado por Derguine-Mecheri et al. (2018) foi executado iniciando-se com a centrifugação do meio (2600xg por 20 minutos) e posterior filtração em membrana com porosidade de 0,2 μm . Em seguida, o pH do líquido metabólico foi ajustado para 2 com HCl 6 mol.L⁻¹ e o meio foi submetido à refrigeração (4°C) durante a noite. Após este período, foi realizada a extração líquido-líquido, utilizando-se acetato de etila (1:1) por três vezes, e secagem do biossurfactante bruto, sob temperatura de 40 °C.

Para o biossurfactante de *C. utilis*, seguiu-se o método proposto por Cameron et al. (1988), adicionando-se 3 volumes de etanol (95,0 % v/v) contendo ácido acético (1,0 % v/v) a um volume de líquido metabólico, mantendo-o sob refrigeração a 4 °C por 16 horas. Após este processo, o precipitado coletado foi centrifugado a 2600xg por 20 minutos, seco sob temperatura de 60 °C, pesado e armazenado sob temperatura entre 25 e 28 °C.

Procedendo-se conforme Selvakumar, Anibabiyans e Madhan (2016) para o biossurfactante de *S. cerevisiae*, após centrifugação (2600xg por 20 minutos), ao volume de líquido metabólico foi adicionado ¼ de volume de acetona, sendo submetido à refrigeração sob temperatura de 4 °C por um período de 24 horas para a precipitação do biossurfactante. Em seguida, o sobrenadante foi novamente submetido à centrifugação a 2600xg durante 20 minutos e o biossurfactante precipitado foi seco a 60°C.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para obtenção da CMC, inicialmente foi pesado 0,1 g dos biossurfactantes isolados, sendo diluídos a uma concentração inicial de 5 g.L⁻¹ e realizada sucessivas diluições com água destilada, sendo posteriormente quantificadas as tensões superficiais das respectivas diluições com auxílio do anel de NOUY.

4.2.2 Análise qualitativa dos biossurfactantes

Os biossurfactantes extraídos foram analisados qualitativamente pela técnica de Cromatografia em Camada Fina (CCF ou TLC - *Thin layer chromatography*). Para tal, uma alíquota do extrato bruto de ambos os biossurfactantes foi aplicada em placas de sílica gel G60 (Merck), usando-se como eluente os solventes hexano:acetona na proporção (v/v) de 70:30. Para visualização das manchas, o revelador anisaldeído foi utilizado, aquecendo-se as

placas por aproximadamente 1 minuto, sendo posteriormente medidos os fatores de retenção (SILVA et al., 2017).

4.2.3 Composição físico-química dos biossurfactantes

Para análise quantitativa dos biossurfactantes selecionados, foram utilizadas as metodologias de ensaio conforme a AOAC (2002). O teor de umidade foi determinado por meio do método gravimétrico, baseado na perda de peso das amostras submetidas a aquecimento em estufa a 105 °C até peso constante (método 985.14). A concentração de proteínas totais foi calculada utilizando-se o método Kjeldahl, baseado na digestão ácida da matéria orgânica seguido da destilação, sendo o nitrogênio posteriormente dosado por titulação; e o valor em nitrogênio multiplicado pelo fator 6,25 (método 992.15). Já para o resíduo mineral fixo (cinzas) o método gravimétrico foi utilizado, baseado na determinação da perda de peso das amostras submetidas à incineração a 550 °C (método 923.03).

Para quantificação da fração lipídica utilizou-se o método de extração a frio de Bligh-Dyer (1959), em que utiliza-se uma mistura de clorofórmio, metanol e água. Já o teor de carboidratos foi obtido a partir da diferença entre 100 e o somatório das determinações de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas.

4.2.4 Análise estrutural e perfil de ácidos graxos dos biossurfactantes

Após caracterização preliminar dos biossurfactantes isolados, estes foram caracterizados estruturalmente utilizando-se as técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Agilent 300) e infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier-Transform Infrared- FT-IR) (Perkin Elmer Spectrun 400) (MORITA et al., 2003). Para o perfil de ácidos graxos, os biossurfactantes isolados foram submetidos ao processo de esterificação para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Neste procedimento, amostras de 25 mg dos biossurfactantes foram submetidas à reação com 0,5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) em metanol a 0,5 mol.L⁻¹ sob agitação em agitador de tubos vórtex por 2 minutos. Em seguida, hexano foi adicionado para separação dos ésteres das moléculas polares, sendo a mistura submetida novamente à agitação e posterior centrifugação (4500 rpm por 6 minutos). Para a realização da análise, a fase orgânica foi coletada e filtrada em membrana de PTFE (Politetrafluoretileno) com porosidade

de 0,22 μm , sendo analisada em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector por ionização de chama (GC/FID) (Agilent Technologies 7890A).

4.2.5 Microscopia de luz das emulsões

As emulsões foram preparadas conforme descrito no item 4.1.6 utilizando-se as soluções de biossurfactante ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2CMC) de ambos os micro-organismos, óleo de motor e óleo vegetal com melhor resultado no índice de emulsificação (E_{24}). Para visualização em microscópio (Nikon Eclipse E-100), adicionou-se um volume de 60 μL de emulsão (após 24 horas de armazenamento a 27-28 $^{\circ}\text{C}$) à uma lâmina de cavidade, permanecendo-o em repouso por 5 minutos para estabilização da mesma. Em seguida, a distribuição de tamanho de partículas foi observada por meio de uma lente objetiva com ampliação de 10 vezes.

4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial e análise termogravimétrica

A análise térmica dos biossurfactantes foi realizada conforme metodologia adaptada de Han et al. (2015) em amostras de biossurfactante de 50 mg, utilizando-se um analisador térmico simultâneo STA 449 F3 (NETZSCH). Para isto, foram realizadas etapas sucessivas de aquecimento/resfriamento/aquecimento, com razão de aquecimento e de resfriamento de 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50,0 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$, na faixa de 40 a 400 $^{\circ}\text{C}$.

4.2.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos biossurfactantes foi determinada mediante três metodologias distintas: capacidade antioxidante total (CAT), sequestro de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) e sequestro de íons superóxido nas concentrações de 1,25, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 e 40,0 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$. A capacidade antioxidante total (% CAT) foi avaliada por meio de ensaio de fosfomolibdênio, de acordo com Pietro et al (1999). Para este ensaio, uma alíquota de 0,1 mL das soluções dos biossurfactantes foi combinada com 1,0 mL de solução composta por ácido sulfúrico (600 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$), fosfato de sódio (28 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$) e molibdato de amônio (4 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$) em tubos, sendo fechados e submetidos à ebulição em banho-maria a 90 $^{\circ}\text{C}$ por 90 min. Após resfriamento, 200 μL de cada solução foram transferidos para uma microplaca (96 poços) e a absorbância foi medida em leitor de placas Elisa (BioTek) a 695 nm, sendo a capacidade antioxidante dos biossurfactantes expressa em relação ao padrão de

ácido ascórbico de concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, cuja atividade antioxidante de referência foi considerada igual a 100%.

Para execução do método de DPPH, adicionou-se 250 μL de solução metanólica $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$ de DPPH em 40 μL de solução dos biossurfactantes, sendo lida a absorbância em leitor de placas Elisa a 517 nm, após 30 minutos de repouso ao abrigo da luz. Em seguida, os percentuais de inibição (% I) foram obtidos com base na porcentagem de DPPH eliminado, sendo calculados utilizando-se a Equação 1.

$$\% I = [(Abs_{CONTROLE} - Abs_{AMOSTRA}) / Abs_{CONTROLE}] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que a $Abs_{CONTROLE}$ corresponde à solução metanólica de DPPH e $Abs_{AMOSTRA}$ à absorbância na presença da solução do biossurfactante. A quantidade de amostra necessária para diminuir a absorbância de DPPH em 50 % (IC50) foi determinada associando valores de %I (Equação 1) com diferentes concentrações da amostra e do controle.

Para avaliação do sequestro de íon superóxido seguiu-se o método descrito por Dasgupta e De (2004). Para isto, foram transferidos para o mesmo tubo 50 μL de solução dos biossurfactantes diluídas em tampão fosfato 150 mmol.L^{-1} , 200 μL de solução de metionina 65 mmol.L^{-1} , 200 μL de solução de EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, 200 μL de solução de cloreto Nitrotetrazolium azul (NBT) $0,375 \text{ mmol.L}^{-1}$ e 200 μL de solução de riboflavina $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. O mesmo procedimento foi realizado para o controle, em que foi adicionado apenas tampão fosfato em substituição às amostras. Em seguida, os tubos foram expostos à luz fluorescente por 15 min com dissipação da luz com auxílio de papel alumínio, sendo posteriormente transferida uma alíquota de 200 μL de cada tubo à uma microplaca de 96 poços para ser lida a absorbância a 560 nm. A capacidade de inibição da redução fotoquímica do NBT foi calculada conforme Equação 2.

$$\% I = [(Abs_{CONTROLE} - Abs_{AMOSTRA}) / Abs_{CONTROLE} - Abs_{BRANCO}] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que a Abs_{BRANCO} corresponde à mesma composição do controle sem exposição à luz fluorescente.

4.2.8 Atividade antibacteriana

Para verificação da atividade antibacteriana foi realizado o ensaio de ágar de difusão em disco adaptado de Bona et al. (2014), utilizando-se as bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* UFPE/MICRO 13, Gram-positiva *Staphylococcus aureus* UFPE/MICRO 2 e Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* UFPE/MICRO 6, na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, correspondente à escala 0,5 de McFarland. Para tal, discos estéreis de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram impregnados com os biossurfactantes isolados, solução de biossurfactante (40 e 20 mg.mL⁻¹) e com o solvente utilizado (DMSO 1%) e, em seguida, aplicados com auxílio de pinça estéril sobre uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (AMH), previamente inoculada com 0,1 mL da bactéria a ser testada. Após este procedimento, as placas foram submetidas à incubação sob temperatura de 30 °C por 24 horas para medição do diâmetro, em mm, da zona de inibição do crescimento. O ensaio foi realizado em triplicata para cada bactéria estudada e os resultados analisados conforme metodologia do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2009), medindo-se os halos de inibição com auxílio de um paquímetro.

4.2.9 Avaliação do potencial citotóxico dos biossurfactantes (Teste do MTT)

O teste do MTT (thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) foi desenvolvido com linhagens das células de fibroblastos (L929) (Figura 6) e macrófagos (RAW 264.7) de camundongos, segundo protocolo descrito por Alley et al. (1988) e Mosmann (1983). Para a realização deste teste, inicialmente foram adicionadas às células de L929 e RAW 264.7, mantidas em frascos de cultura a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂, solução de tripsina (0,5%), deixando em repouso por 5 minutos. Em seguida, a ação da tripsina foi inibida com a adição do meio DMEM (Meio Basal Eagle Modificado), sendo realizada a contagem em câmara de Neubauer para cálculo da concentração a ser adicionada nos poços (10^5 células/mL). Desta forma, adicionou-se à cada poço da microplaca 190 µL de meio de cultura contendo as células na concentração especificada, com exceção dos poços referentes ao branco (apenas meio de cultura DMEM) (Figura 7). Posteriormente, a microplaca foi incubada, para estabilização, em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂, por um período de 24h. Decorrido este tempo, foram adicionados 10 µL das soluções dos biossurfactantes para concentração final de 200 µg.mL⁻¹, sendo reincubados nas mesmas condições atmosféricas por 72h. O controle negativo e positivo foi realizado, respectivamente,

com meio de cultura DMEM e solução tampão fosfato (pH 7,4) a 150 mmol.L^{-1} . Após o período de 72h, adicionou-se $25 \text{ }\mu\text{L}$ do corante MTT (5 mg.mL^{-1}) e a placa incubada por 3 horas, sendo posteriormente aspirado o meio de cultura com o MTT e adicionado $100 \text{ }\mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Após a adição do DMSO, a microplaca foi submetida à leitura de absorbância em leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm . Os valores de absorbância obtidos foram comparados com os do controle negativo, sendo a percentagem de inibição calculada no programa *GraphPad Prism 7.0 demo*.

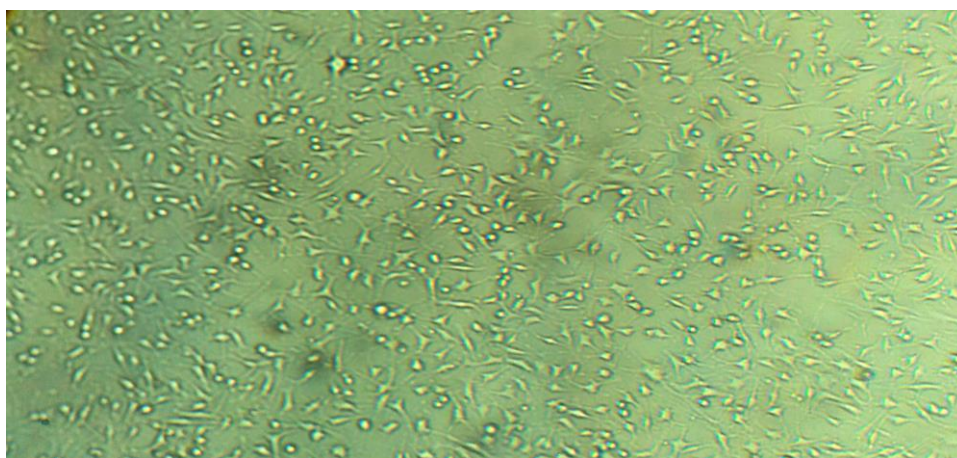


Figura 6 – Linhagem não-cancerígena de fibroblastos de camundongo (L929)

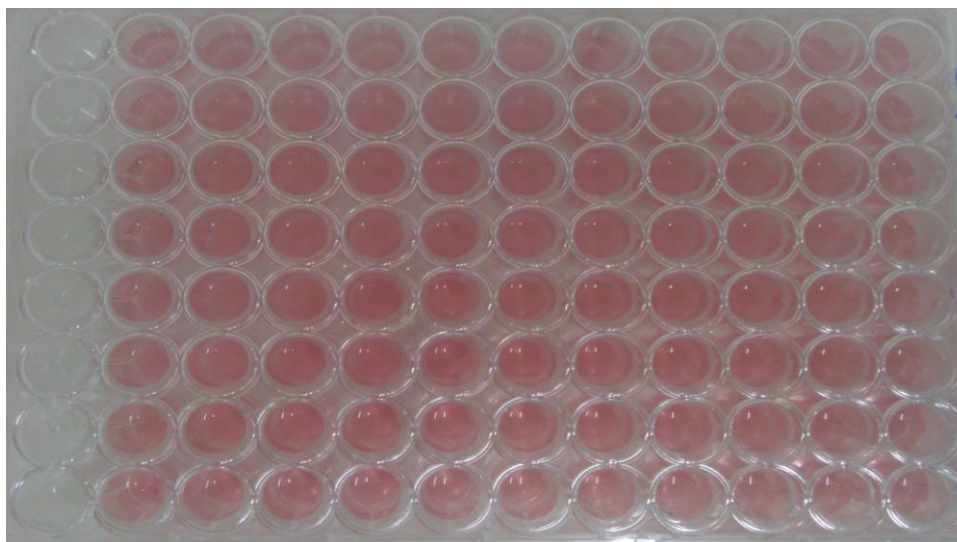


Figura 7 – Microplaca com células L929 na concentração 10^5 em meio DMEM

4.3 PREPARO DAS FORMULAÇÕES DOS BISCOITOS TIPO *COOKIE*

4.3.1 Materiais e preparação dos biscoitos

Para processamento dos biscoitos foram adquiridas amostras comerciais dos seguintes ingredientes: farinha de trigo branco, margarina, açúcar granulado, essência de baunilha, fermento em pó (contendo pirofosfato de sódio, bicarbonato de sódio e amido de milho), clara e gema pasteurizados em diferentes formulações (Tabela 2), sendo utilizada como referência uma formulação padrão adaptada de Zouari et al. (2016).

Tabela 2 – Composição da massa de biscoito tipo *cookie*

Ingredientes	Padrão (%)	Formulação A (%)	Formulação B (%)
Farinha de trigo branco	47,0	47,0	47,0
Margarina	20,0	20,0	20,0
Açúcar granulado	15,0	15,0	15,0
Essência de baunilha	3,0	3,0	3,0
Fermento em pó	1,0	1,0	1,0
Clara pasteurizada	10,0	10,0	10,0
Gema pasteurizada	4,0	2,0	0,0
Biossurfactante	0,0	2,0	4,0
Total	100,0	100,0	100,0

FONTE: autor

A massa de biscoito das formulações A e B foram preparadas seguindo-se a formulação padrão com substituição parcial e total da gema pasteurizada pelo biossurfactante produzido por *C. utilis* e por *S. cerevisiae* (meio 6), totalizando-se 5 tipos de massa distintos.

Para preparação da massa, a clara, gema e/ou biossurfactante, a margarina e o açúcar granulado foram homogeneizados com um misturador planetário (Arno ciranda) sob uma velocidade média-alta durante 3 minutos com raspagem para baixo a cada minuto. Em seguida, foi adicionada a essência de baunilha, fermento em pó e sal, homogeneizando-se novamente à velocidade média por 1 minuto, sendo por fim, adicionada a farinha, homogeneizando-se a mistura pela última vez durante 3 minutos, com velocidade baixa do misturador.

Para preparação dos biscoitos, a massa foi ligeiramente pressionada e então cortada com um cortador de biscoito circular (diâmetro interno de 50 mm). Posteriormente, as peças de massa foram colocadas em um tabuleiro com papel manteiga, sendo assadas (150 °C por 5 minutos e 180°C por mais 15 minutos) em um forno elétrico (Philco). Após este período os biscoitos foram retirados do forno, resfriados durante 2 horas, pesados, embalados em sacos plásticos selados e armazenados durante 24 horas à temperatura de 25-28 °C para análises subsequentes.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BISCOITOS

4.4.1 Propriedades físicas dos biscoitos assados

Após a cocção dos biscoitos foram analisados o peso, diâmetro, espessura e fator de espalhamento. Para determinação do peso, foi utilizada uma balança analítica de precisão de 0,001 g (BEL Engineering). Para medir o diâmetro, foi adotado o procedimento descrito por Noor Aziah, Mohamad Noor e Ho (2012), em que quatro amostras foram selecionadas aleatoriamente e colocadas uma ao lado da outra para medida do diâmetro total com auxílio de um paquímetro digital (Mtx). Em seguida, todos os biscoitos foram girados por 90 °C e o novo diâmetro foi medido, sendo o diâmetro final expresso como a média das duas medidas dividido por quatro. Já a espessura foi medida empilhando-se quatro biscoitos, um acima do outro, por quatro vezes. Por meio da divisão do valor do diâmetro dos biscoitos pela altura dos biscoitos foi calculado o fator de espalhamento (ZOULIAS; OREOPOULOU; TZIA, 2002).

4.4.2 Análise físico-química e determinação do valor energético dos biscoitos após cocção

Para determinação do teor de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos, procedeu-se conforme item 4.2.1. Para determinação do valor energético foram multiplicados os valores em massa de carboidratos, lipídios e proteínas por 4, 9 e 4, respectivamente, sendo somados posteriormente.

4.4.3 Análise de textura dos biscoitos com e sem biossurfactante

A massa dos biscoitos antes da cocção foi submetida à análise do perfil de textura (TPA), sendo determinados os parâmetros de firmeza (resistência à ruptura), coesividade e elasticidade. Já a textura dos biscoitos após a cocção foi avaliada por meio do teste de compressão para determinar apenas a firmeza. Para ambos os ensaios foi utilizado um analisador de textura Brookfield CT3, equipado com uma célula de carga de 245 N. Desse modo, as amostras antes e após cocção foram comprimidas a 50% da sua altura original a uma velocidade constante de 1 mm.s^{-1} , utilizando-se uma placa de perspex (largura: 60 mm). Para análise de TPA, foi realizada uma segunda compressão após um intervalo de 5 segundos, sendo a firmeza definida como a força a 50 % da altura da amostra na primeira compressão, a coesão como a razão entre o trabalho de compressão no segundo ciclo de compressão e o trabalho de compressão no primeiro ciclo; e a elasticidade calculada utilizando-se o valor da altura relativa da amostra restante quando a força inicial foi registrada durante a segunda compressão (ZOUARI et al., 2016).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o procedimento one-way no software Statistica® (versão 7.0) seguindo-se um modelo linear de análise unidirecional de variância (ANOVA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP a partir de determinações em triplicata e as diferenças examinadas usando-se o teste post-hoc de Tukey com nível de significância de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS

5.1.1 Tensão superficial e interfacial e índice de emulsificação

Uma das propriedades mais importantes de um surfactante é sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial por meio da formação de micelas. A tensão superficial é considerada como a força de atração entre as moléculas de um líquido, e a interfacial, a interação entre duas fases distintas, uma aquosa e uma hidrofóbica (LUNA et al., 2013; SANTOS et al., 2016). Quanto maior a concentração de um surfactante no meio, maior a formação de micelas e menores as tensões superficial e interfacial. Os resultados médios de tensão superficial e interfacial dos meios após o processo de produção dos biossurfactantes estão apresentados na Tabela 3

Tabela 3 – Tensão superficial e interfacial após o processo de produção dos biossurfactantes.

Biossurfactante		Tensão (mN.m ⁻¹)	
		Superficial	Interfacial
<i>S. cerevisiae</i>	Meio 1	39,50 ± 0,09 ^a	NQ
	Meio 2	44,10 ± 0,13 ^b	14,31 ± 0,14 ^a
	Meio 3	36,37 ± 0,06 ^c	6,87 ± 0,04 ^b
	Meio 4	45,88 ± 0,15 ^d	17,32 ± 0,15 ^c
	Meio 5	26,45 ± 0,02 ^e	13,99 ± 0,18 ^{da}
	Meio 6	26,64 ± 0,06 ^{fe}	9,12 ± 0,29 ^e
<i>C. utilis</i>		35,33 ± 0,19 ^g	2,53 ± 0,02 ^f

Meios na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

NQ = Não quantificado.

Avaliando-se os resultados de tensão encontrados para o biossurfactante produzido por *C. utilis*, observou-se que este demonstrou uma boa capacidade de redução da tensão superficial do meio de produção, de $57,75 \pm 0,20$ mN.m⁻¹ (meio antes do processo de produção) para $35,33 \pm 0,19$ mN.m⁻¹ e tensão interfacial de 40 mN.m⁻¹ para $2,53 \pm 0,02$ mN.m⁻¹. Segundo Luna et al. (2013), surfactantes que são capazes de reduzir a tensão

superficial da água de 72 para 35 mN.m⁻¹ e a tensão interfacial frente o n-hexadecano de 40 para 1 mN.m⁻¹, são considerados bons agentes tensoativos. No entanto, de acordo com Santos et al. (2016), a tensão interfacial é considerada baixa para valores abaixo de 7 mN.m⁻¹, sendo elevada apenas quando são obtidos valores acima de 18 mN.m⁻¹. Comparando este resultado com o apresentado por Campos, Stamford e Sarubbo (2014), que obtiveram um valor médio de $3,71 \pm 0,15$ mN.m⁻¹ utilizando a mesma levedura, ambos são semelhantes, sendo considerada suficientemente efetiva a ação do biossurfactante.

Comparando-se o valor de tensão superficial do meio obtido com *C. utilis* ($35,33 \pm 0,19$ mN.m⁻¹) com os valores apresentados por Almeida et al. (2017) utilizando-se a *C. tropicalis* UCP0996 em um meio contendo 2,5% de melaço de cana-de-açúcar, 2,5% de óleo de fritura e 2,5% de licor de milho, os valores são bastante próximos: $34,12 \pm 0,07$ mN.m⁻¹ (biorreator 2 L) e $35,60 \pm 0,05$ mN.m⁻¹ (biorreator 50 L). Resultados aproximados também foram encontrados por Campos, Stamford e Sarubbo (2014) usando *C. utilis* UFPEDA 1009 em diferentes formulações de meio de cultivo, obtendo-se valores de $37,18 \pm 1,01$ a $48,06 \pm 0,30$ mN.m⁻¹, sendo o valor mais próximo utilizando-se o resíduo de óleo de canola como fonte de carbono.

Analisando-se os resultados obtidos com *S. cerevisiae*, não foi possível quantificar a tensão interfacial do meio 1, provavelmente devido ao valor desta tensão ser inferior ao limite de detecção e sensibilidade do equipamento. Em relação aos valores de tensão superficial, tanto o meio 5 como o meio 6 apresentaram resultados bastante próximos ($26,45 \pm 0,02$ e $26,64 \pm 0,06$ mN.m⁻¹, respectivamente), sendo necessário comparar seus resultados de tensão interfacial, cujo melhor valor foi obtido a partir do meio 6 ($9,12 \pm 0,29$ mN.m⁻¹). Este meio, apesar de apresentar tensão interfacial superior à 7 mN.m⁻¹, apresenta-se como melhor alternativa, visto que foram obtidos valores de tensão superficial baixas utilizando-se apenas resíduos como fonte de carbono, nitrogênio e minerais.

Outra forma de avaliar as propriedades de um biossurfactante é por meio de sua atividade de emulsificação frente hidrocarbonetos e/ou compostos insolúveis em água. Desta forma, o índice de emulsificação (E₂₄) é um método rápido e qualitativo para determinar as propriedades emulsificantes de um surfactante. Conforme Campos et al. (2015), a estabilidade destas emulsões é avaliada como indicador da atividade superficial, não obstante a capacidade de permanecer estável não esteja sempre associada a uma redução na tensão superficial. Apesar de não estar ainda esclarecida a função fisiológica dos biossurfactantes, é conhecida e apresentada por diversos autores a capacidade de solubilizar e emulsionar diferentes compostos hidrofóbicos. A Tabela 4 apresenta o índice de emulsificação após 24 horas (E₂₄)

dos meios contendo os biossurfactantes produzidos pelas leveduras frente os óleos de canola, soja, milho, girassol e motor.

Tabela 4 – Índice de emulsificação após o processo de produção dos biossurfactantes

Biossurfactante		E ₂₄ (%)				
		Óleo de canola	Óleo de soja	Óleo de milho	Óleo de girassol	Óleo de motor
<i>S. cerevisiae</i>	Meio 1	15,24±0,21 ^a	29,81±0,26 ^a	35,83±1,71 ^a	26,11±0,26 ^a	72,75±1,87 ^a
	Meio 2	30,20±0,81 ^b	28,38±1,12 ^{ba}	36,54±2,72 ^{ba}	37,75±1,01 ^b	70,69±2,44 ^{ba}
	Meio 3	11,11±0,52 ^{ca}	14,81±5,24 ^c	9,06±2,34 ^c	35,38±1,09 ^{cb}	91,07±2,53 ^c
	Meio 4	11,54±2,72 ^{dca}	15,71±3,97 ^{dc}	3,77±0,10 ^d	3,77±0,10 ^d	87,75±2,18 ^{dc}
	Meio 5	34,78±3,07 ^{eb}	37,75±1,96 ^e	38,61 ±0,73 ^{eba}	43,56±2,68 ^e	66,09±0,81 ^{eb}
	Meio 6	42,86±1,26 ^f	41,07±2,53 ^{fe}	41,96±1,26 ^{fe}	37,50±2,53 ^{fc}	94,58±2,43 ^{fc}
<i>Candida utilis</i>		35,19±0,03 ^{ge}	35,19±0,08 ^{gfeba}	35,19±0,03 ^{geba}	37,04±0,00 ^{gfcba}	36,94±0,03 ^g

Meios na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

De acordo com os resultados da Tabela 4, todos os meios apresentaram valores de E₂₄ com diferenças significativas em relação ao mesmo óleo. A partir do meio com o biossurfactante produzido por *C. utilis*, todos os valores apresentaram-se abaixo de 40%, sendo o maior valor obtido com o óleo de girassol (37,04 ± 0,00%). Já para *S. cerevisiae*, o meio 6 também apresentou os maiores percentuais de emulsificação entre os óleos avaliados, tendo como melhor resultado em relação aos óleos vegetais utilizando-se o óleo de canola (42,86 ± 1,26%).

Quanto maior o percentual de E₂₄, melhor a atividade de emulsificação do biossurfactante com o composto hidrofóbico. Comparando-se com os valores apresentados na literatura, Campos, Stamford e Sarubbo (2014) obtiveram índices de emulsificação com o biossurfactante produzido por *C. utilis* UFPEDA 1009, de 43, 73, 73, 33 e 30% para os óleos de soja, girassol, milho, arroz e motor, respectivamente, utilizando-se meio contendo 5% de óleo de fritura de canola, 6% de D-glicose, 0,20% de NH₄NO₃ e 0,30% de extrato de levedura. Utilizando-se a *C. sphaerica* UCP0995 em meio suplementado com 9,0% de resíduo de óleo de soja e 9,0% de licor de milho, Luna et al. (2015) apresentaram valores de E₂₄ com o óleo de motor, milho e soja de, respectivamente, 78,12 ± 0,37%, 21,74 ± 0,41% e 24,0 ± 0,53%, próximos aos obtidos pelos biossurfactantes produzidos por *S. cerevisiae* com os meios 1 e 2 frente os mesmos óleos.

Diante dos resultados encontrados, o biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* com o meio 6 (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina), foi o escolhido para estudos posteriores de isolamento, caracterização e determinação de suas propriedades, com posterior aplicação na formulação alimentícia, juntamente com o biossurfactante produzido por *C. utilis*.

5.1.2 Métodos de extração

A avaliação dos métodos de extração objetiva avaliar qual deles resulta em um maior rendimento e melhor aspecto do produto, gastando-se um menor volume de solvente, uma vez que as propriedades do biossurfactante isolado do meio são influenciadas por cada metodologia utilizada, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Rendimento e aspecto dos biossurfactantes isolados por cada método de extração

Solvente	<i>C. utilis</i>		<i>S. cerevisiae</i>		Referência
	R obtido (g.L ⁻¹)	Aspecto	R obtido (g.L ⁻¹)	Aspecto	
Etanol + ác. acético	48,05 ± 0,21	Granuloso	—	—	Cameron et al., 1988
Acetato de etila PA	36,74 ± 0,38	Oleoso	5,83 ± 0,11	Oleoso	Bhatia; Saharan, 2015
Acetona PA	20,93 ± 0,18	Oleoso e granuloso	4,43 ± 0,25	Granuloso	Johny, 2013
Acetato de etila PA	38,93 ± 0,25	Oleoso	6,16 ± 0,20	Oleoso	Shah et al., 2017
Acetato de etila PA	13,10 ± 0,04	Oleoso	5,15 ± 0,07	Oleoso	Derguine-mecheri et al., 2018
Acetato de etila PA	24,22 ± 0,23	Oleoso	5,84 ± 0,34	Oleoso	Desenvolvido em laboratório Selvakumar;
Acetona PA	—	—	5,93 ± 0,11	Granuloso	Anibabiyans; Madhan, 2016

R = Rendimento.

De acordo com a Tabela 5, para o biossurfactante produzido por *C. utilis*, o maior rendimento obtido ($48,05 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$) foi a partir do método de Cameron et al. (1988), utilizando-se os solventes etanol e ácido acético na proporção 3:1 com o meio centrifugado. Por este método, obteve-se um precipitado granuloso de cor marrom. Utilizando-se acetato de etila como solvente de extração, foi possível obter o biossurfactante na forma oleosa, com coloração mais clara que o método anterior e um rendimento menor: $38,93 \pm 0,25 \text{ g.L}^{-1}$, método proposto por Shah et al. (2017), $36,74 \pm 0,38 \text{ g.L}^{-1}$ seguindo-se o apresentado por Bhatia e Saharan (2015) e $24,22 \pm 0,23 \text{ g.L}^{-1}$ com o método desenvolvido em laboratório. Os métodos que requeriam ajuste de pH (JOHNY, 2013; DERGUINE-MECHERI et al., 2018) foram os que apresentaram rendimento menor, não sendo preferíveis para escolha. Em relação à viabilidade, o método desenvolvido em laboratório apresenta-se como a melhor escolha, uma vez que requer menor volume de solvente (50 mL para 100 mL de meio), sem necessidade das etapas iniciais de centrifugação e filtração, obtendo-se um extrato oleoso límpido, considerado como o mais adequado para aplicação posterior em formulações alimentícias substituindo a gordura animal.

Para *S. cerevisiae*, os resultados apresentaram-se semelhantes, obtendo-se com o método de Shah et al. (2017), um rendimento de $6,16 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$ utilizando-se acetato de etila como solvente de extração, seguido do método de Bhatia e Saharan (2015), em que obteve-se $5,83 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$ de biossurfactante bruto e do método desenvolvido em laboratório, a partir do qual foi possível obter um rendimento de $5,84 \pm 0,34 \text{ g.L}^{-1}$. Utilizando-se acetona como solvente, tanto o método de Johnny (2013), quanto o de Selvakumar, Anibabiyans e Madhan (2016) apresentaram um aspecto granuloso, cujos rendimentos apresentaram-se semelhantes. Entretanto, o aspecto do biossurfactante com estes métodos não é preferível para a aplicação futura pretendida neste trabalho.

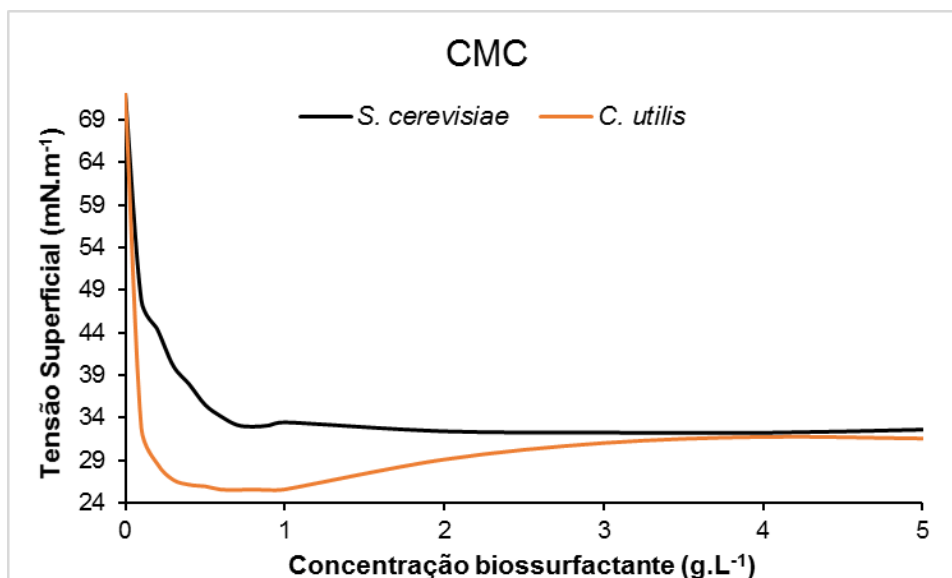
Sendo assim, diante dos resultados de rendimento, o método desenvolvido em laboratório foi o escolhido para isolamento dos biossurfactantes.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

5.2.1 Concentração Micelar Crítica (CMC)

O gráfico relacionando a tensão superficial em função da concentração dos biossurfactantes apresenta-se disposto na Figura 8.

Figura 8 – CMC dos biossurfactantes produzidos por *S. cerevisiae* (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina) e *C. utilis* (6% óleo de fritura de canola e 6% de glicose)



Uma vez que um bom surfactante deve apresentar alta eficiência e eficácia, ambos os biossurfactantes produzidos apresentaram esta capacidade em concentrações menores que 1 g.L⁻¹, sendo o biossurfactante produzido por *Candida utilis* o que apresentou melhor resultado (CMC = 0,6 g.L⁻¹), enquanto que o biossurfactante de *S. cerevisiae* teve CMC igual a 0,8 g.L⁻¹.

Conforme descrito por Santos et al. (2016), a Concentração Micelar Crítica (CMC) é atingida no ponto em que um aumento adicional na concentração de biossurfactante não leva a uma redução adicional em tensão superficial. Enquanto que as tensões superficiais e interfaciais influenciam na eficácia de um surfactante, o CMC reflete na eficiência do mesmo, variando de 0,001 a 2 g.L⁻¹ para o biossurfactante. Desta forma, quanto menor a concentração do biossurfactante para atingir este fim, maior a sua eficiência.

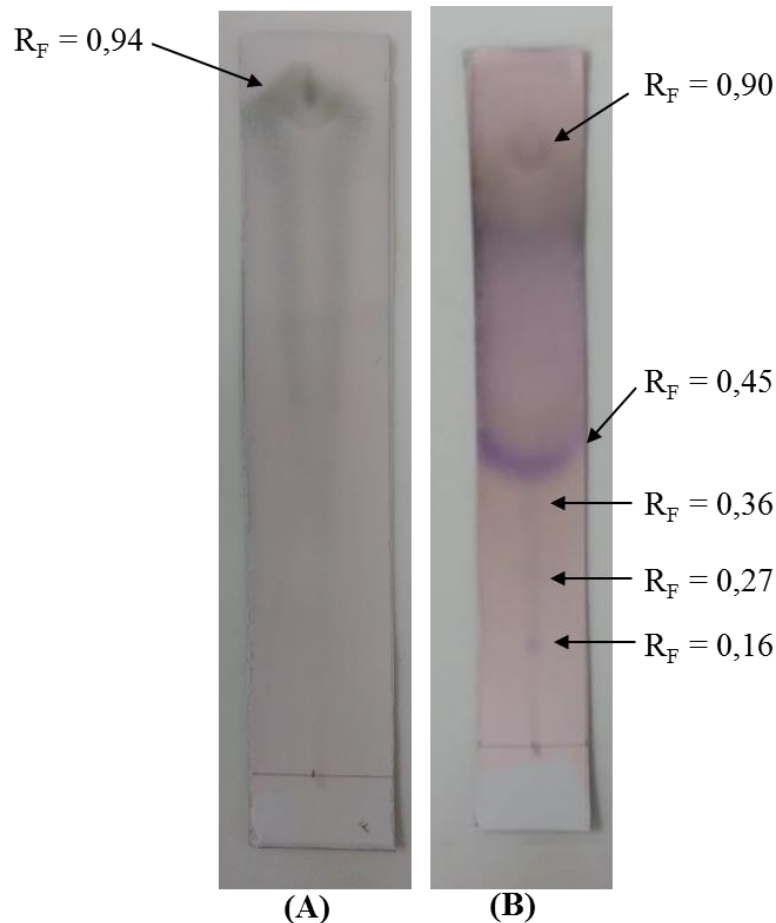
5.2.2 Análise da composição dos biossurfactantes

5.2.2.1 Análise qualitativa

Para a avaliação qualitativa da presença de compostos químicos em uma dada substância, a técnica de Cromatografia em Camada Fina (CCF ou TLC - *Thin layer*

chromatography) é a mais utilizada por ser mais simples e com menor custo. Os resultados obtidos nas placas de TLC para os biossurfactantes isolados utilizando-se um revelador geral (anisaldeído), apresentam-se na Figura 9.

Figura 9 – Cromatografia em camada fina dos biossurfactantes produzidos por *C. utilis* (A) e *S. cerevisiae* (B) utilizando-se anisaldeído como revelador



De acordo com a Figura 7 (A), foi observada uma única mancha grande com fator de retenção, R_F , de 0,94 do biossurfactante produzido por *C. utilis*, semelhante à mancha da placa B com R_F igual a 0,90. Já a placa do biossurfactante de *S. cerevisiae* (B) apresentou outras 4 manchas com fatores de retenção de 0,16, 0,27, 0,36 e 0,45, indicando a presença de diferentes compostos não observados na placa A.

Realizando-se este tipo de análise em um biossurfactante produzido pela levedura *Candida sphaerica* UCP0995, Luna et al. (2013) obtiveram manchas com fatores de retenção de 0,7 e 0,8. Resultados semelhantes também foram obtidos por Santos et al. (2013) e Silva et al. (2017), utilizando-se *Candida lipolytica* UCP0988 e *Pseudomonas cepacia* CCT6659, respectivamente, os quais também obtiveram manchas com R_F em torno de 0,8. Utilizando-se

o reagente de Syldatk (anissaldeído:ácido sulfúrico:ácido acético glacial 0,5:1:50), Bhatia e Saharan (2015) apresentaram como resultado uma mancha escura indicando que o biossurfactante produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* LF14 apresenta uma estrutura glicolipídica. Entretanto, uma análise estrutural mais detalhada foi necessária para confirmação. Comparando com as manchas da placa D de R_F 0,27 e 0,45, Abbasi et al. (2013) obteve duas manchas com valores de R_F semelhantes: 0,27 e 0,57 que, após uma caracterização estrutural por ES-MS, concluíram que correspondiam à raminolipídeos.

5.2.2.2 Análise quantitativa

Os percentuais de umidade, lipídeos, proteínas, resíduo mineral fixo (cinzas) e carboidratos dos biossurfactantes produzidos por *C. utilis* e *S. cerevisiae* estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição físico-química dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras *C. utilis* (6% óleo de fritura de canola e 6% de glicose) e *S. cerevisiae* (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina).

Parâmetro	Composição físico-química (%)	
	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Umidade	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Lipídeos	96,43 ± 0,67	80,04 ± 3,86
Proteínas	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Cinzas	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,19
Carboidratos	3,21 ± 0,66	19,64 ± 3,66

Em relação à composição físico-química de biossurfactantes produzidos por leveduras do gênero *Candida*, diversos estudos já foram realizados, os quais descreveram estruturas glicolipídicas e complexos carboidrato-proteína-lipídeo. Esta diversidade na estrutura ocorre em função da linhagem do micro-organismo, tipo de substrato utilizado para cultivo (hidrofóbico ou miscível em água) entre outros fatores (CAMPOS et al., 2013).

Uma mesma espécie de levedura do gênero *Candida* pode produzir biossurfactantes com estrutura glicolipídica apresentando percentuais bioquímicos distintos, como *C. sphaerica*, a qual pode produzir tanto um glicolípido constituído de 70% de lipídios e 15% de carboidratos (RUFINO; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2013) como constituído de 75% de lipídios e 25% de carboidratos (SOBRINHO et al., 2008). Outra espécie deste mesmo

gênero, como *C. lipolytica*, pode produzir biossurfactante com percentual de carboidratos ainda maior (30 %) e 70 % de lipídeos, conforme descrito por Santos et al. (2013). Comparando-se estes valores com os apresentados na Tabela 6, o biossurfactante produzido por *Candida utilis* apresentou teor de lipídeos acima dos valores encontrados na literatura ($96,43 \pm 0,67\%$), com teor de carboidratos baixo ($3,21 \pm 0,66\%$). Desta forma, é necessário o emprego de outras técnicas para determinação da estrutura molecular deste biossurfactante.

No que diz respeito ao biossurfactante produzido por *S. cerevisiae*, a sua estrutura é composta basicamente de lipídeos e carboidratos, visto que a soma percentual destes componentes é maior que 90%. Selvakumar, Anibabiyans e Madhan (2016), utilizando-se os métodos de antrona e vanilina-ácido fosfórico para verificação da presença de carboidratos e lipídeos, respectivamente, em um biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* MTCC 181, obtiveram o resultado correspondente a um glicolipídeo. Desta forma, a partir dos resultados da Tabela 6, pode-se afirmar que o biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* apresenta a estrutura carboidrato-lipídeo, a ser confirmada por meio das técnicas analíticas de caracterização estrutural.

5.2.3 Estrutural

5.2.3.1 FIT-IR e Espectrometria de RMN

Os espectros de infravermelho dos biossurfactantes isolados de *C. utilis* e *S. cerevisiae* apresentam-se nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

Figura 10 – Espectro de infravermelho do biossurfactante produzido por *C. utilis* com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose

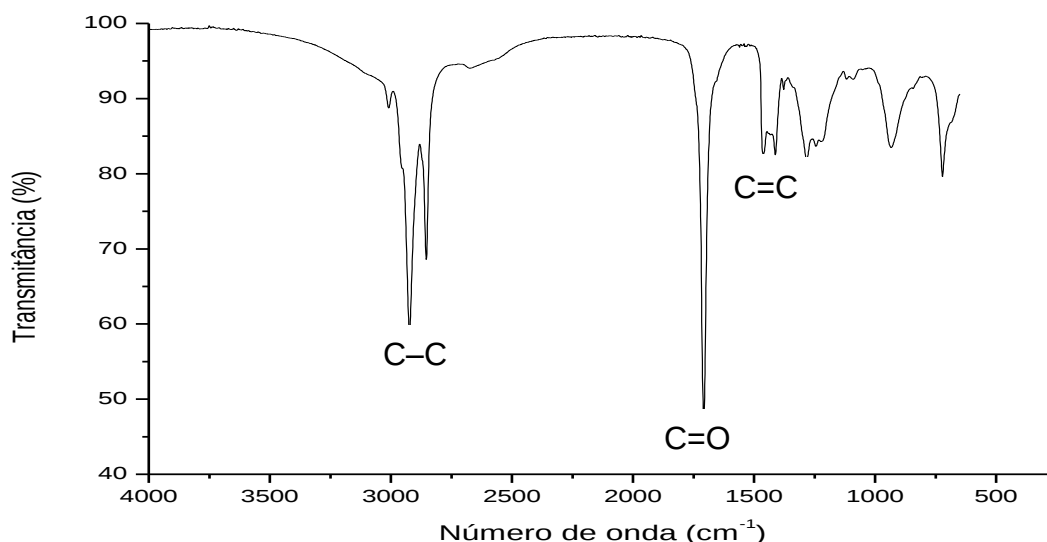
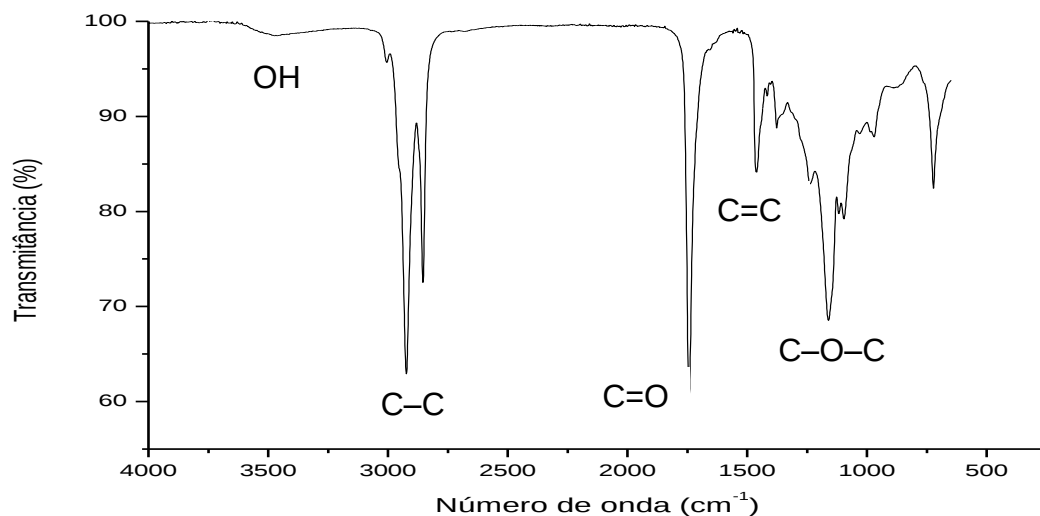


Figura 11 – Espectro de infravermelho do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhoцина



De acordo com a Figura 10, o espectro do biossurfactante de *C. utilis* apresentou regiões de estiramento entre 1500 e 2000 cm^{-1} e 2700 e 3000 cm^{-1} , indicando a presença de possíveis grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e ligações simples entre carbonos ($\text{C}-\text{C}$), respectivamente. Em aproximadamente 1460 cm^{-1} , também foi observado estiramento referente à ligação dupla entre carbonos.

No espectro do biossurfactante de *S. cerevisiae* (Figura 11), estiramentos nas faixas entre 1500 e 2000 cm^{-1} e 2700 e 3000 cm^{-1} também foram observados, bem como em aproximadamente 1465 cm^{-1} , referente à ligação dupla entre carbonos. Além disso, uma pequena região de estiramento entre as faixas de 3000 e 3500 cm^{-1} foi observada, indicando a presença de grupos hidroxila (OH) na molécula, assim como um estiramento relativamente grande em 1165 cm^{-1} , o qual apresenta probabilidade de ser um grupamento éster no composto.

Comparando-se os resultados obtidos com os espectros relatados na literatura, Santos et al. (2016) apresentaram espectro semelhante ao obtido com o produto de *C. utilis* utilizando-se a levedura *C. lipolytica* cultivada em meio com 5% de gordura animal e 2,5% de licor de milho. Por outro lado, espectro bastante semelhante ao do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* foi publicado por Maddikeri, Gogate e Pandit (2015), no qual foram observados os mesmos estiramentos em regiões muito próximas de um biossurfactante (soforolipídeo) produzido pela levedura *Starmerella bombicola* em meio enriquecido com glicose (100 g.L^{-1}), extrato de levedura (10 g.L^{-1}), uréia (1 g.L^{-1}) e substratos lipídicos (40 g.L^{-1}).

Para elucidação da estrutura dos biossurfactantes, a análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear também foi realizada, sendo os espectros de hidrogênio e carbono apresentados nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Figura 12 – Espectro de $^1\text{HMRN}$ registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por *C. utilis* com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose

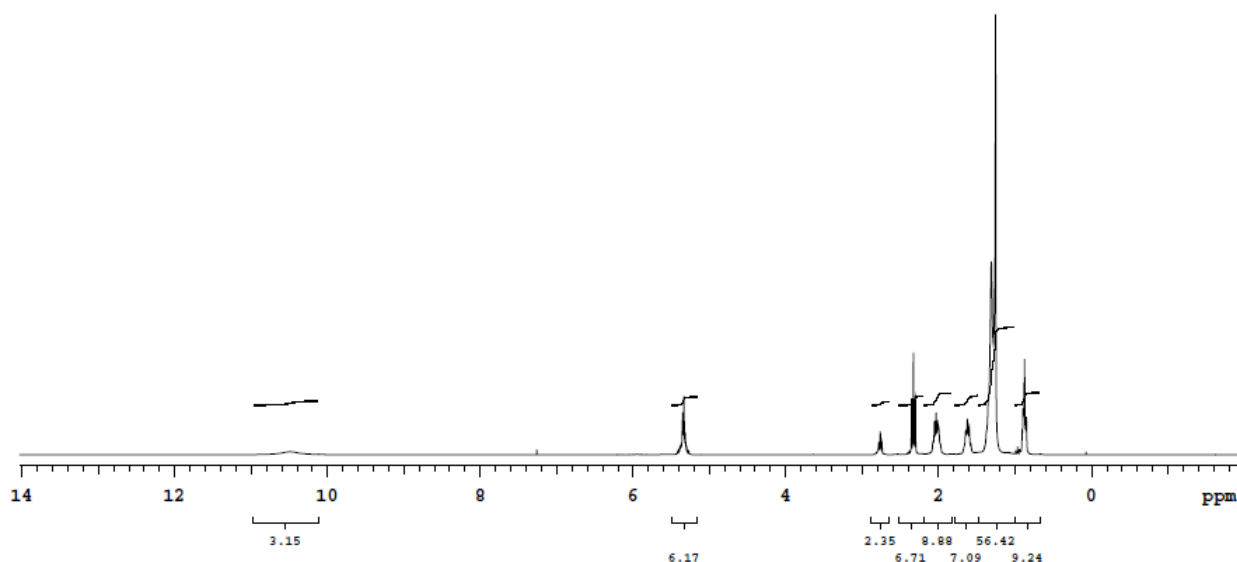


Figura 13 – Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por *C. utilis* com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose

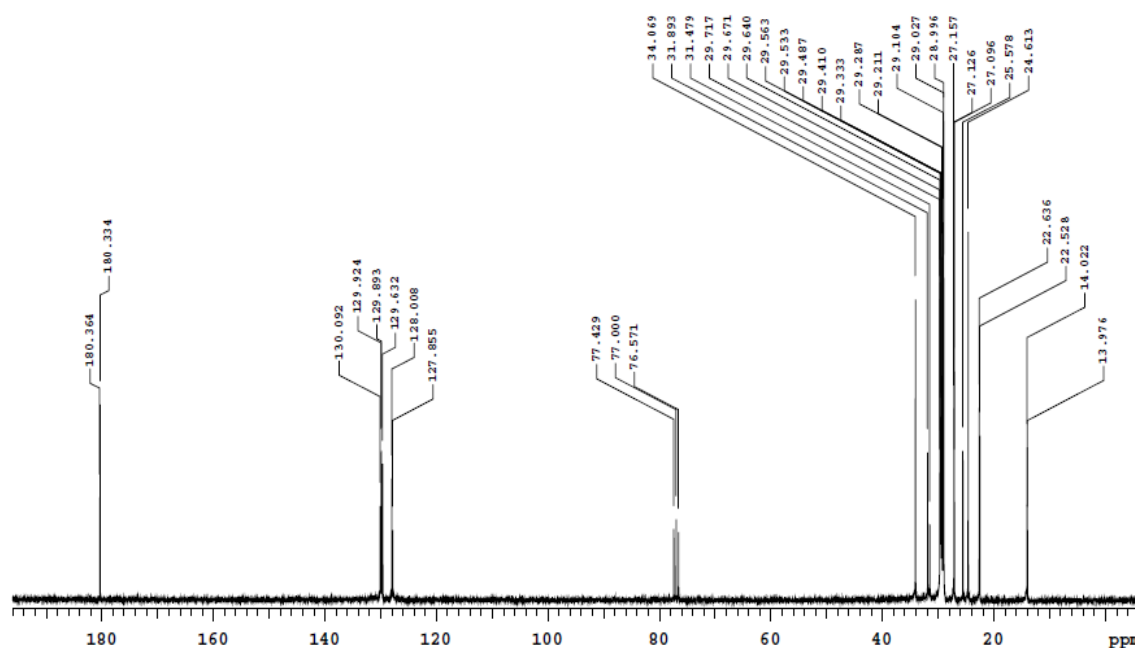


Figura 14 – Espectro de ^1H RMN registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina

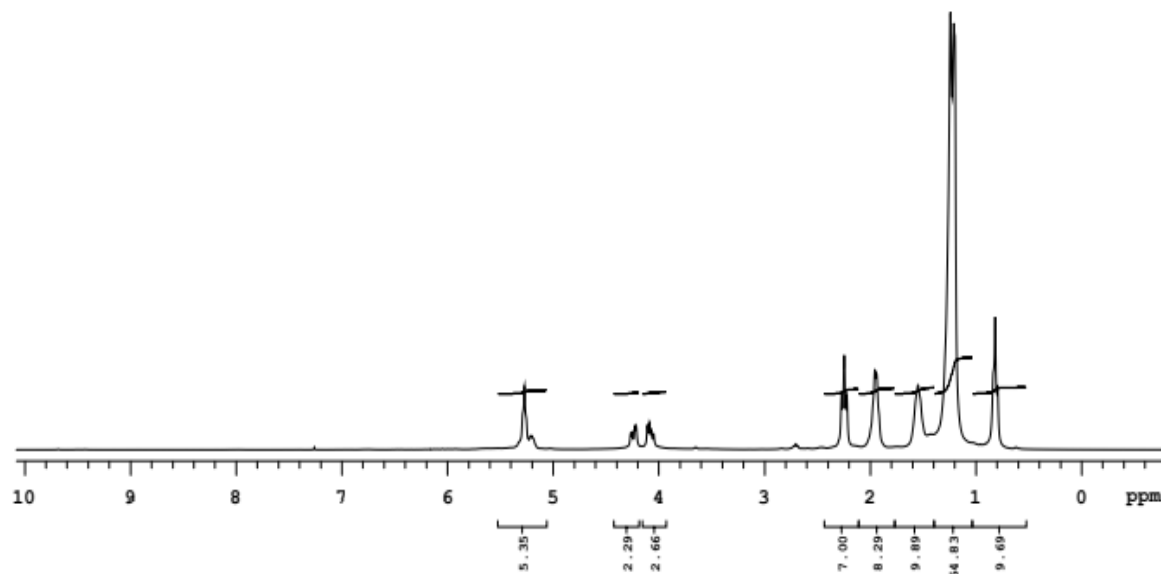
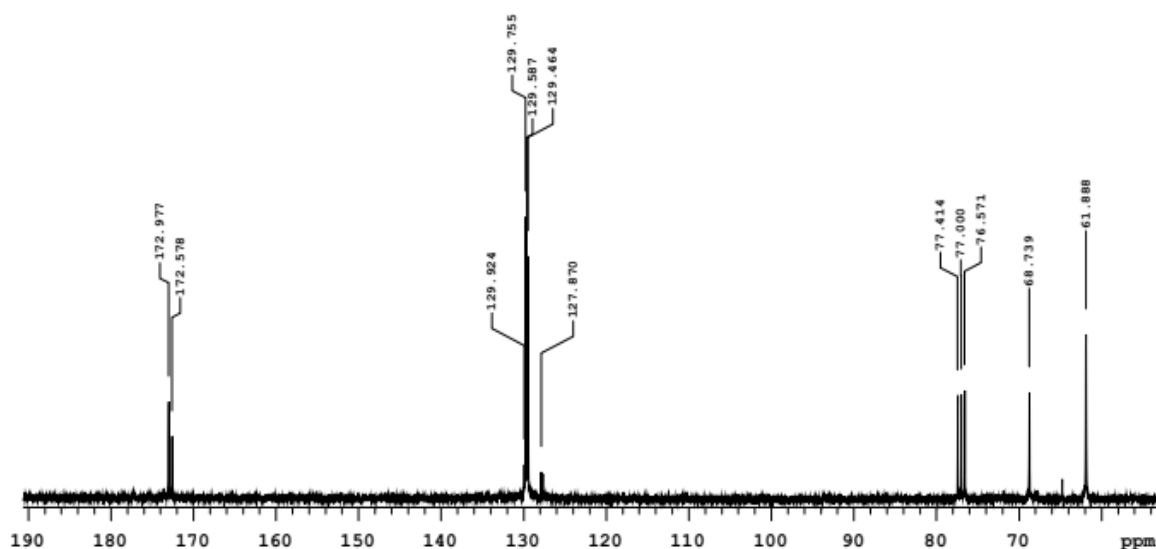


Figura 15 – Espectro de ^{13}C RMN registrado em DCCL_3 do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina



De acordo com a Figura 12, o ^1H NMR indicou a presença de hidrogênio ligado ao grupo ácido carboxílico na região entre 10 e 11 ppm, assim como ligado a carbono insaturado (5 a 5,5 ppm). Ainda de acordo com este espectro, foram observados sinais bastante próximos nas regiões entre 0,7 e 2,4 ppm, indicando a presença de grupos metil (0,7 a 0,9 ppm), região apolar da molécula (1,1 a 1,7 ppm), hidrogênio ligado ao carbono insaturado (1,8 a 2,1 ppm), e hidrogênio ligado ao carbono vizinho ao carbono insaturado (2,1 a 2,4 ppm). Estes

resultados são confirmados pelo espectro de carbono (Figura 13), em que mostra um sinal característico da presença de ácido carboxílico em 180 ppm, ligações duplas entre 120 e 140 ppm e carbonos alifáticos na região de 10 a 40 ppm. Desta forma, pode-se afirmar que o biossurfactante produzido por *C. utilis* é um tipo de ácido carboxílico metabolizado.

Observando-se a Figura 14, o espectro de hidrogênio do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* apresentou os mesmos sinais do espectro da Figura 12, exceto o sinal entre 10 e 11 ppm, correspondente à presença de ácido carboxílico. Entretanto, este apresentou sinal entre 3,8 e 4,4 ppm, indicando a presença de hidrogênio vizinho ao oxigênio da ligação éster da molécula. Este sinal é confirmado no espectro de carbono (Figura 15), no qual mostra um sinal característico da presença de grupamento éster em região menor que 180 ppm (170-180 ppm). Assim, infere-se que o biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* é caracterizado como um glicolípídeo, apresentando em sua estrutura ligações éster entre ácido graxos e carboidratos, confirmadas na análise físico-química.

Resultados semelhantes aos espectros das Figuras 12 e 13 foram publicados por Santos et al. (2017), em que obteve uma biomolécula surfactante com estrutura de ácido carboxílico a partir da levedura *Candida lipolytica*. Em comparação com as Figuras 14 e 15, Bhatia e Saharan (2016) apresentaram espectro de RMN com os mesmos sinais, no qual foi possível afirmar que a biomolécula possui uma estrutura glicolípídica, metabolizada a partir da levedura *Pichia sorbitophila*.

5.2.3.2 Perfil de ácidos graxos por GC/FID

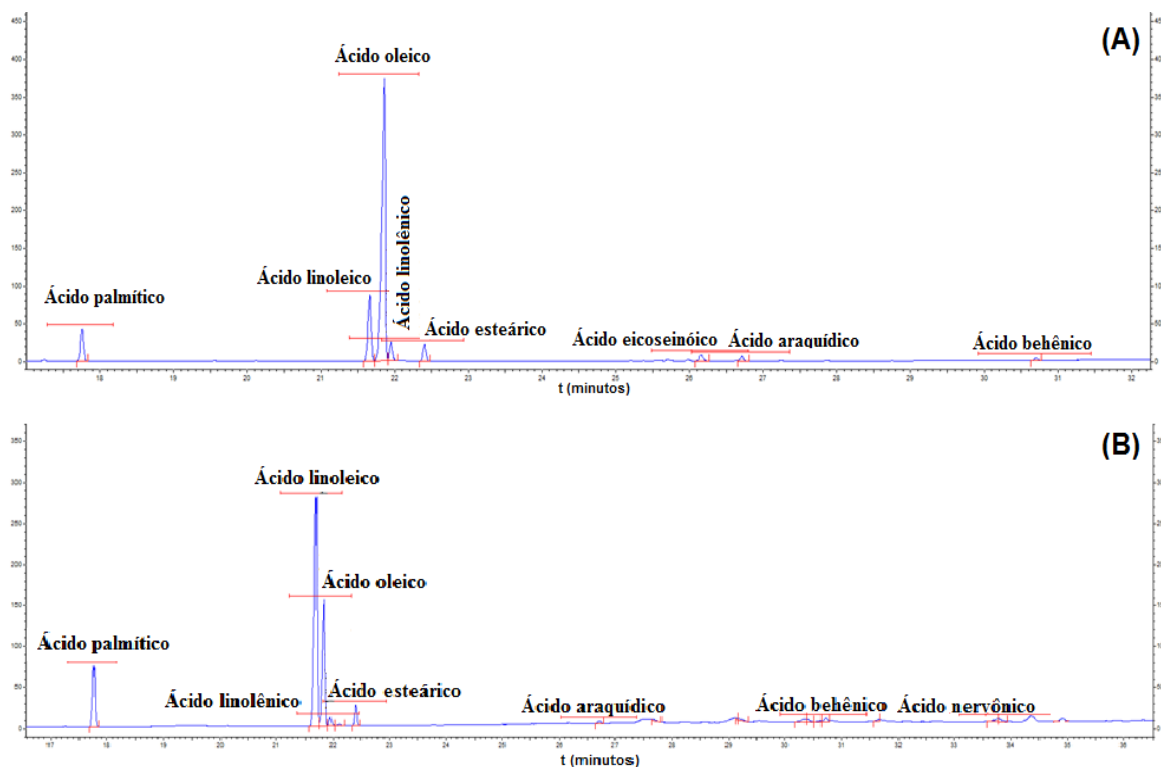
A identificação dos ácidos graxos presentes nos biossurfactantes foi realizada utilizando-se um padrão externo (FAME Supelco™ mix C₄-C₂₄, Bellefonte, PA, USA), sendo a composição percentual (%), calculada conforme normalização das áreas dos picos, e os cromatogramas apresentados na Tabela 7 e Figura 16, respectivamente.

Tabela 7 – Perfil de ácidos graxos para os biossurfactantes produzidos por *C. utilis* (6% óleo de fritura de canola e 6% de glicose) e *S. cerevisiae* (1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina)

Ácido graxo	Biossurfactante	
	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ácido láurico (C12:0)	ND	ND
Ácido mirístico (C14:0)	ND	ND
Ácido palmítico (C16:0)	6,51 ± 0,02%	11,46 ± 0,04%
Ácido linoleico (C18:2)	14,6 ± 0,67%	50,58 ± 0,25%
Ácido oleico (C18:1)	68,63 ± 0,61%	28,79 ± 0,79%
Ácido linolênico (C18:3)	3,69 ± 0,03%	1,84 ± 0,06%
Ácido esteárico (C18:0)	3,41 ± 0,04%	3,83 ± 0,03%
Ácido eicoseinóico (C20:1)	1,54 ± 0,09%	ND
Ácido araquídico (C20:0)	1,07 ± 0,02%	0,41 ± 0,00%
Ácido behênico (C22:0)	0,55 ± 0,00%	0,91 ± 0,56%
Ácido nervônico (C24:0)	ND	1,56 ± 0,77%

ND = Não determinado.

Figura 16 – Cromatogramas do perfil de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos por *C. utilis* (A) e *S. cerevisiae* (B).



A partir dos valores da Tabela 8 verificou-se que houve diferenças no percentual de ácidos graxos entre os biossurfactantes analisados, exceto pela ausência dos ácidos láurico e mirístico, nos dois biossurfactantes. O ácido graxo predominante no biossurfactante produzido por *C. utilis* foi o ácido oleico ($68,63 \pm 0,61\%$), enquanto que no produto de *S. cerevisiae* o ácido predominante foi o linoleico ($50,58 \pm 0,25\%$), ambos com 18 carbonos em sua estrutura. Segundo Lopes et al. (2004), quanto maior o percentual dos ácidos graxos insaturados com 18 carbonos em sua estrutura, há maior valor nutricional da molécula, uma vez que são ácidos graxos essenciais não sintetizados pelo organismo humano, favorecendo sua aplicação em sistemas alimentares.

Ácidos graxos com 18 carbonos também foram previamente encontrados como os principais em vários estudos de glicolípidos surfactantes. Silva et al. (2017) e Vecino et al., (2014), na caracterização estrutural de biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas cepacea* e *Lactobacillus pentosus*, respectivamente, obtiveram em maior percentual (cerca de 80%) o ácido esteárico. Entretanto, o perfil de ácidos graxos de um biossurfactante produzido pela levedura *S. cerevisiae* LF14 publicado por Bhatia e Saharan (2015) apresentou o ácido palmítico (16 carbonos) como o predominante na cadeia (83,65%).

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que os biossurfactantes estudados apresentam em sua composição lipídica diversos ácidos graxos com diferentes proporções, apresentando potencial de aplicação em formulações alimentícias devido ao seu valor nutricional atribuído ao maior percentual de ácidos graxos insaturados com 18 carbonos (ácido oleico, linoleico e linolênico).

5.2.4 Distribuição do tamanho de partículas das emulsões

A avaliação da distribuição do tamanho de partículas de emulsões é importante para o estudo das propriedades físicas de um biossurfactante, uma vez que é possível observar o tamanho da gota da emulsão, a qual pode estar relacionada a diversos processos industriais como a floculação. Em aplicações comerciais, é importante que as emulsões permaneçam estáveis, sendo determinante o estudo da diminuição ou aumento da concentração de biossurfactante para esta estabilidade (HAN et al., 2015; LUO et al., 2017). As fotomicrografias das emulsões das soluções dos biossurfactantes produzidos ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2 CMC) com os óleo de canola, girassol e motor apresentam-se nas Figura 17 e 18.

Figura 17 – Fotomicrografia de emulsões preparadas com soluções ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2 CMC) de biossurfactante de *S. cerevisiae* com meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina

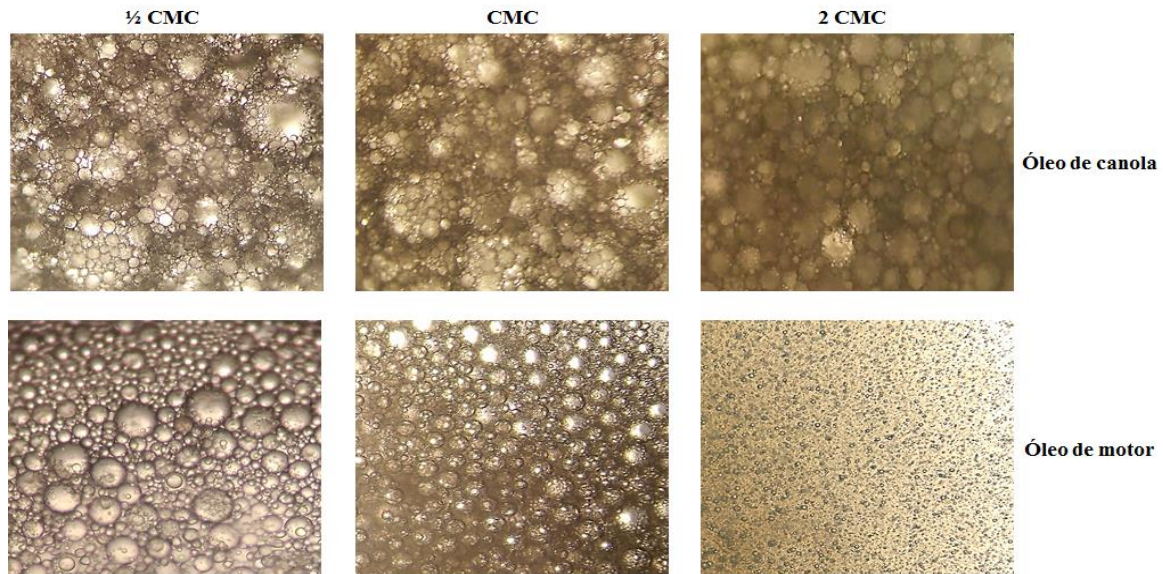
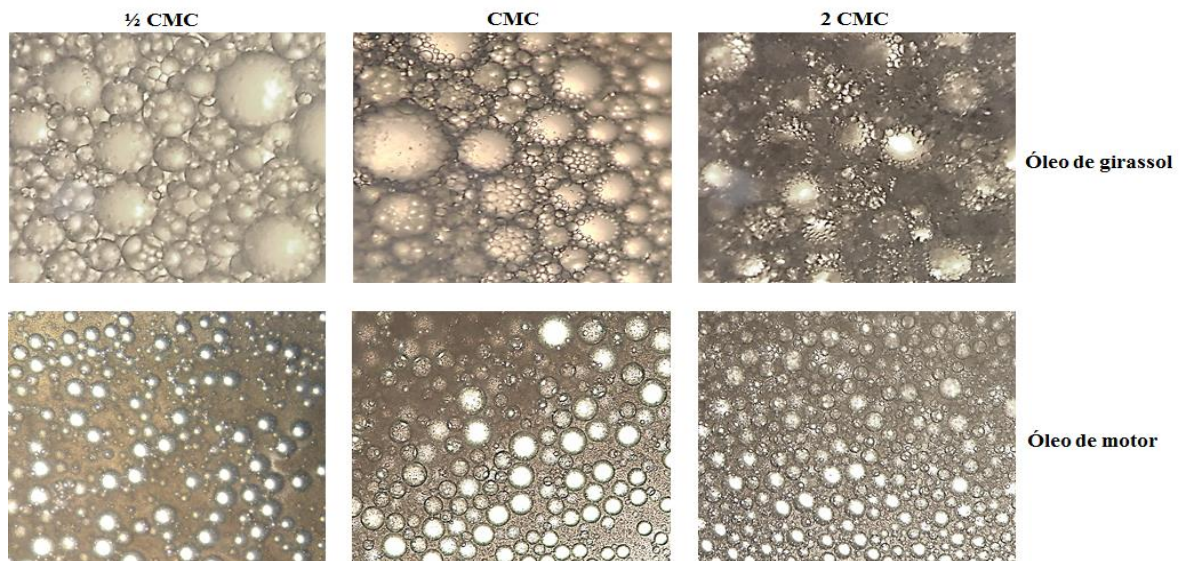


Figura 18 – Fotomicrografias de emulsões preparadas com soluções ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2 CMC) de biossurfactante de *C. utilis* com meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose



De acordo com Rocha e Silva et al. (2017), o tamanho, a forma e a distribuição do tamanho das gotículas depende de vários fatores como a tensão interfacial, natureza do emulsificante, presença de sólidos e propriedades do óleo e da fase aquosa, sendo a estabilidade da emulsão inversamente proporcional ao tamanho da gotícula. Observando-se as Figuras 17 e 18, as emulsões com o óleo de motor apresentaram tamanhos de partícula menores do que nas emulsões com os óleos vegetais, como esperado, uma vez que os

resultados de índice de emulsificação após 24 horas (E24) com este óleo foram maiores (Tabela 4). Além disso, com o óleo de motor as partículas apresentaram formato mais uniforme e ficaram mais separadas, resistentes à coalescência. De forma geral, observou-se que o aumento na concentração do biossurfactante resultou na diminuição do tamanho das partículas, ou seja, quanto maior a concentração de um dado biossurfactante, maior a estabilidade da emulsão. Como não há registros na literatura de análises por microscopia das emulsões com biossurfactantes produzidos pelas leveduras deste trabalho, não foi possível comparar os resultados. Entretanto, Han et al. (2015) realizou esta análise com emulsões de óleo de girassol com exopolissacarídeos produzidos por espécies de *Bacillus* e com emulsificante comercial goma guar, obtendo fotomicrografias semelhantes às emulsões dos biossurfactantes com óleo de motor. Portanto, os resultados revelam que os dois biossurfactantes produzidos têm grande potencial para serem utilizados como emulsificantes.

5.2.5 Termoestabilidade

Para utilização dos biossurfactantes produzidos em escala industrial, é necessário avaliar sua estabilidade frente mudanças de temperatura, verificando-se os efeitos às propriedades físicas e/ou químicas. Desta forma, o emprego da termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são essenciais para este fim, uma vez que é possível medir a variação de massa, estabilidade térmica, água livre e água ligada, pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, diagramas de fase, transições vítreas, entre outros, ou os produtos de reação de uma substância em função da temperatura, enquanto a mesma é submetida a um programa controlado de temperatura (IONASHIRO, 2005). Os termogramas para ambos os biossurfactantes apresentam-se nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 – TG (azul) e DSC (preto) do biossurfactante produzido por *C. utilis*

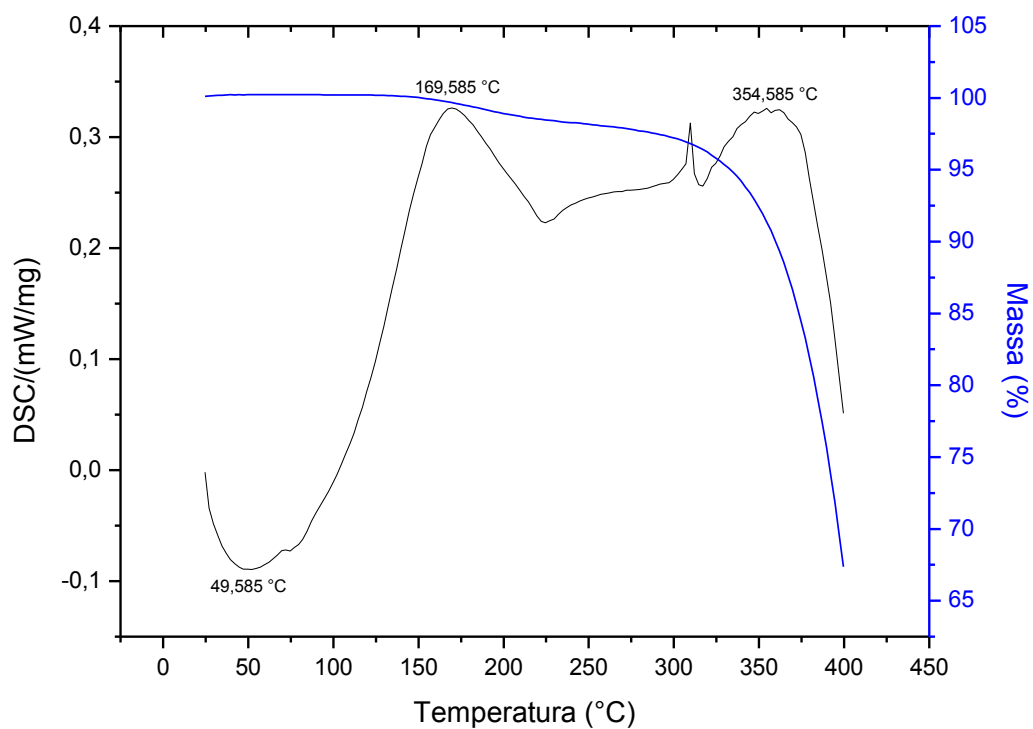
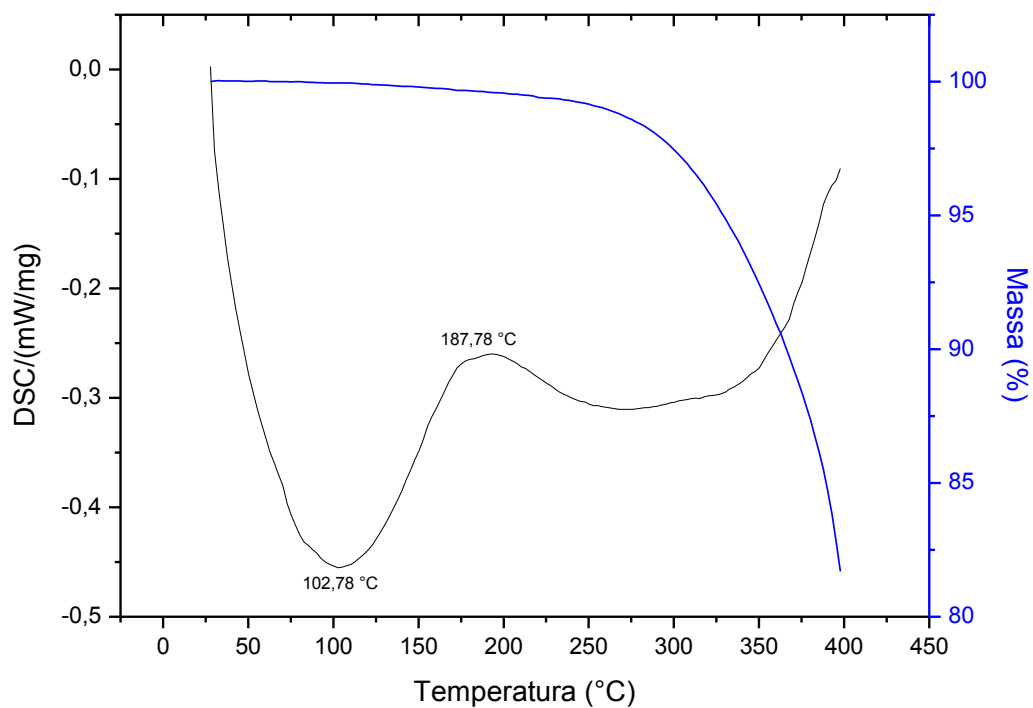


Figura 20 – TG (azul) e DSC (preto) do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae*



Em relação à análise termogravimétrica, foi possível obter as curvas (em azul) de perda de massa dos biossurfactantes em função da temperatura. Conforme as Figuras 19 e 20, os biossurfactantes tiveram comportamento de decomposição semelhante; entretanto, o

biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* apresentou estabilidade térmica maior, com perda de massa de apenas 0,37% na temperatura de 180,28 °C. Já o produto de *C. utilis* apresentou perda de massa de 0,77% no mesmo intervalo de temperatura. A partir de 250 °C para o produto de *S. cerevisiae* e 300 °C para o biossurfactante de *C. utilis*, há uma diminuição significativa da massa até a temperatura final (400 °C), com variação de perda de massa na faixa de 15,75 e 30,78%, respectivamente. Considerando que a degradação térmica ocorre quando há perda de massa de aproximadamente 5% (KOURMENTZA et al., 2017), os biossurfactantes sofrem este tipo de degradação apenas a partir de 320 °C.

No que concerne a análise de DSC, o termograma do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* (Figura 20) apresentou pico exotérmico com temperatura de cristalização (T_C) de 102,78 °C (temperatura de início de 40,28 °C) e o pico de fusão endotérmico em 187,78 °C (temperatura de início logo após o pico exotérmico). Para o biossurfactante produzido por *C. utilis* (Figura 19), o termograma mostrou pico exotérmico com temperatura de cristalização (T_C) de 49,58 °C (temperatura de início de 42,08 °C). Já os picos de fusão foram observados em 169,58 °C (temperatura de início em 72,08 °C) e 354,58 °C (iniciando em 317,08 °C).

Na literatura não há relatos deste tipo de análise em biossurfactantes produzidos pelas leveduras estudadas. Entretanto, análises calorimétricas em dois biossurfactantes produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061 (HAN et al., 2015) obtiveram resultados semelhantes em relação à temperatura de cristalização do produto obtido por *S. cerevisiae*: 123,79 e 125,82 °C. E relação à temperatura de fusão, Kourmentza et al. (2017) apresentaram resultado semelhante ao obtido para ambas as leveduras: 166,40 °C para raminolipídeo oriundo de *Burkholderia thailandensis*, mostrando-se de acordo com a faixa relatada na literatura de 162 a 181 °C.

Conforme Han et al. (2015), os biossurfactantes que possuem maior pico de fusão apresentam maior estabilidade térmica. Além disso, compostos que possuem temperaturas de degradação relativamente altas são considerados vantajosos, pois sua aplicação se torna ainda mais ampla frente condições extremas de temperatura. Sendo assim, uma vez que os biossurfactantes serão submetidos ao processo de cocção dos biscoitos sob temperatura máxima de 180 °C, eles não sofrerão perda significativa de sua massa, apresentando-se estáveis e adequados à aplicação.

5.2.6 Atividade Antioxidante

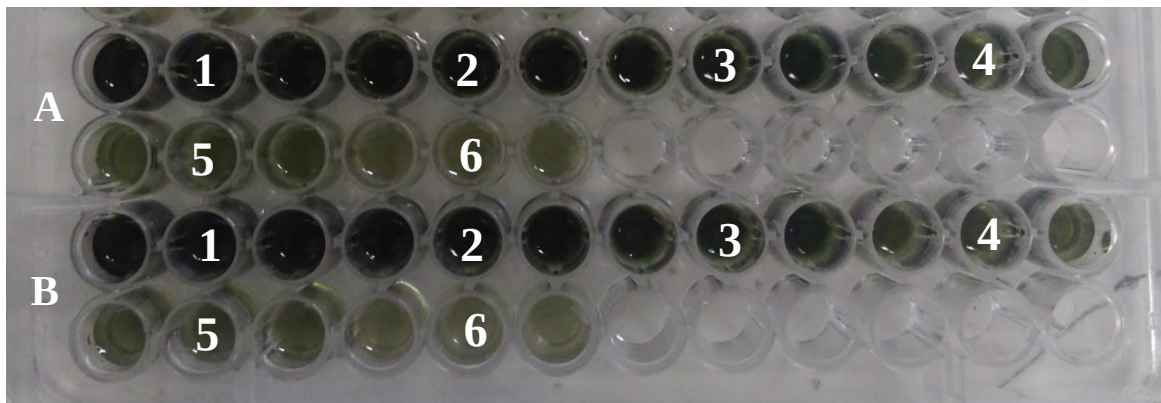
A atividade antioxidante pode ser medida a partir da captura de radicais orgânicos, como o 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), ou redução de complexos como o fosfomolibdênio, sendo visualmente observada a partir da mudança de coloração das soluções, proporcional à capacidade antioxidante. Os percentuais de capacidade antioxidante total (complexo fosfomolibdênio) e de inibição (DPPH) das soluções dos biossurfactantes apresentam-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Percentual de sequestro de radicais DPPH (% I) e da capacidade antioxidante total (% CAT) em diferentes concentrações dos biossurfactantes de *C. utilis* e *S. cerevisiae*

Concentração biossurfactante	% I (<i>C. utilis</i>)	% CAT (<i>C. utilis</i>)	% I (<i>S. cerevisiae</i>)	% CAT (<i>S. cerevisiae</i>)
40000	17,60 ± 0,00	-	21,35 ± 0,25	-
20000	16,52 ± 1,38	210,12 ± 0,21	13,09 ± 0,62	212,70 ± 4,87
10000	9,23 ± 1,61	114,45 ± 1,64	11,37 ± 0,06	120,59 ± 0,12
5000	8,58 ± 0,06	73,27 ± 0,77	9,87 ± 0,32	77,34 ± 0,08
2500	4,61 ± 1,12	43,08 ± 1,73	8,48 ± 0,75	50,56 ± 1,27
1250	4,18 ± 0,59	25,35 ± 0,65	5,36 ± 0,12	30,62 ± 0,06

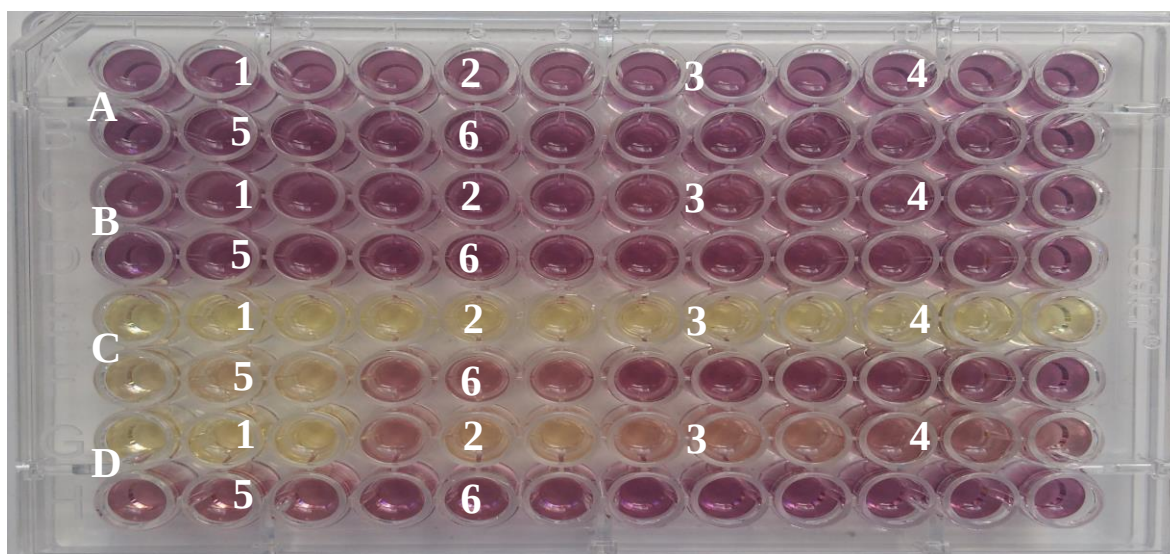
Conforme Tabela 8, os biossurfactantes de *C. utilis* e *S. cerevisiae* apresentaram resultados satisfatórios em relação à técnica de redução do complexo fosfomolibdênio. De acordo com Pietro et al. (1999), este método fundamenta-se na redução de molibdênio VI em molibdênio V pela substância antioxidante, alterando-se a coloração de amarelo claro para verde (Figura 21). Comparando-se os percentuais de CAT dos biossurfactantes com a concentração de referência do ácido ascórbico (1000 µg.mL⁻¹), na concentração de 1250 µg.mL⁻¹ os biossurfactantes de *C. utilis* e *S. cerevisiae* apresentaram, respectivamente, apenas 25 e 30% de atividade. Já na concentração de 20000 µg.mL⁻¹, mostraram % CAT maior que 200%, indicando uma relação linear com o aumento da concentração. Desta forma, para concentrações acima de 5000 µg.mL⁻¹, por este método, os biossurfactantes podem ser considerados antioxidantes em potencial, podendo ser aplicados em formulações alimentícias com esta finalidade, já que o ácido ascórbico é considerado um agente redutor reconhecido e bastante utilizado.

Figura 21 – Capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio para as amostras de biossurfactante de *S. cerevisiae* (A) e *C. utilis* (B), da maior concentração (1) para a menor (6)



Em relação ao ensaio com o DPPH, a atividade antioxidante dos biossurfactantes apresentou resultados de percentual de inibição com um perfil diferente, podendo ser justificado pelas diferenças no princípio do método e nos mecanismos de ação antioxidante. Neste ensaio, avaliou-se a capacidade dos biossurfactantes e de dois padrões (Trolox e BHT) de impedir a oxidação do radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina e consequentemente promovendo mudança de coloração de roxo para amarelo (Figura 22), responsável pela diminuição da absorbância (Turnes et al., 2014).

Figura 22 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das amostras de biossurfactante de *C. utilis* (A) e *S. cerevisiae* (B) e dos padrões Trolox (C) e BHT(D), da maior concentração (1) para a menor (6)



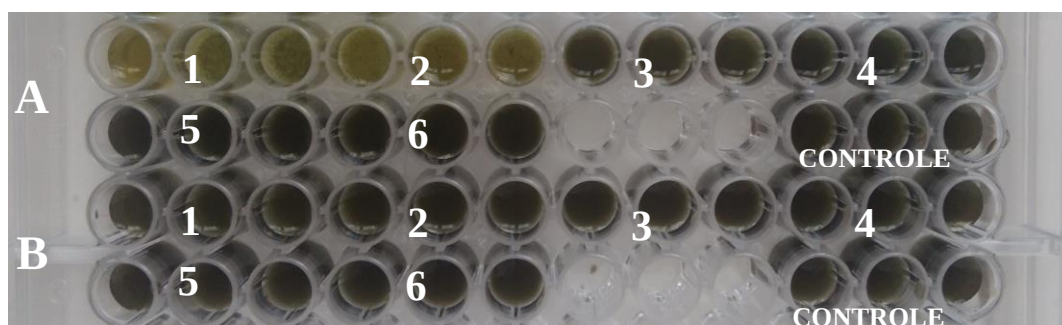
A partir da Figura 22, verificou-se que os biossurfactantes apresentaram atividade antioxidante inferior ao Trolox e ao BHT, sendo necessário, portanto, uma quantidade maior dessas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, alterando a coloração de roxo para amarelo. Sendo assim, os biossurfactantes não apresentam atividade antioxidante em concentrações inferiores à 20 mg.mL⁻¹ frente ao método de redução do radical DPPH, apesar de nesta concentração ainda apresentar percentual de inibição baixo ($16,52 \pm 1,38$ e %) em relação aos padrões na concentração de 1 mg.mL⁻¹ ($88,84 \pm 0,25\%$ para o trolox e $83,37 \pm 0,59\%$ para o BHT). Comparando este resultado com biossurfactantes de espécies de lactobacilos publicados por Merghnia et al. (2017), houve diferenças significativas no %I, uma vez que exibiram atividade sequestrante para radicais livres de DPPH de 74,6% e 77,3% na concentração de 5 mg.mL⁻¹, cerca de 10 e 8 vezes mais que o biossurfactante de *C. utilis* e *S. cerevisiae*, respectivamente, na mesma concentração. Desta forma, os biossurfactantes não podem ser considerados fortes antioxidantes pelo método de sequestro de radicais DPPH nas concentrações estudadas.

A partir do ensaio de sequestro de íons superóxido, foi possível avaliar se os biossurfactantes apresentam esta capacidade por meio do sistema ribloflavina-luz-NBT. O sequestro destes íons é observado visualmente por meio da mudança de coloração de azul para amarelo. Os resultados apresentam-se na Tabela 9 e Figura 23.

Tabela 9 – Percentual de sequestro de íons superóxidos (% I) em diferentes concentrações dos biossurfactantes de *C. utilis* e *S. cerevisiae*

Concentração biossurfactante (µg/mL)	% I (<i>C. utilis</i>)	%I (<i>S. cerevisiae</i>)
40000	$32,97 \pm 1,72$	$76,79 \pm 5,29$
20000	$21,64 \pm 0,89$	$76,31 \pm 3,40$
10000	$5,04 \pm 1,89$	$42,64 \pm 0,62$
5000	$4,06 \pm 0,61$	$18,75 \pm 0,37$
2500	$1,29 \pm 0,31$	$0,36 \pm 0,00$
1250	-	-

Figura 23 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro íons superóxido das amostras de biossurfactante de *S. cerevisiae* (A) e *C. utilis* (B), da maior concentração (1) para a menor (6)



Com base nos resultados deste ensaio, observou-se que o biossurfactante de *S. cerevisiae* apresentou maior capacidade de sequestro dos íons $O_2^{\cdot-}$ em relação ao biossurfactante de *C. utilis*. Segundo Vadivel et al. (2011), avaliar a capacidade antioxidante por métodos de sequestro é importante, pois naturalmente estes íons estão presentes no organismo humano. No caso dos íons superóxido, este é produzido durante a respiração celular e pode ser tóxico ao organismo humano, uma vez que pode destruir células, danificar a membrana celular e o DNA, inativar enzimas e dar origem a outros radicais livres. Desta forma, os biossurfactantes avaliados apresentam potencial de aplicação em alimentos pobres em antioxidantes.

5.2.7 Atividade antibacteriana

O teste de difusão em disco, também chamado de difusão em placas, é um método físico, o qual relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo teste com a concentração do composto avaliado. Este teste é utilizado para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado micro-organismo isolado, sendo o método mais confiável por não ser influenciado pela velocidade de crescimento (BONA et al., 2014).

Os dados de diâmetro do halo de inibição dos biossurfactantes frente cada bactéria testada e as placas de leitura, apresentam-se na Tabela 10 e Figuras 24 e 25, respectivamente.

Tabela 10 – Diâmetro (mm) do halo de inibição dos biossurfactantes frente bactérias patogênicas

Biossurfactante	Concentração	D _{HALO} de inibição (mm)		
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. utilis</i>	Extrato	SA	3,19 ± 0,24	SA
	40 mg.mL ⁻¹	SA	0,74 ± 0,00	SA
	20 mg.mL ⁻¹	SA	0,74 ± 0,00	SA
<i>S. cerevisiae</i>	Extrato	6,70 ± 0,21 ^a	2,56 ± 0,79 ^b	1,31 ± 0,00 ^c
	40 mg.mL ⁻¹	5,56 ± 0,55 ^a	2,80 ± 0,81 ^b	SA
	20 mg.mL ⁻¹	4,56 ± 0,54 ^a	2,11 ± 0,26 ^b	SA

Diâmetros na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

SA = Sem atividade.

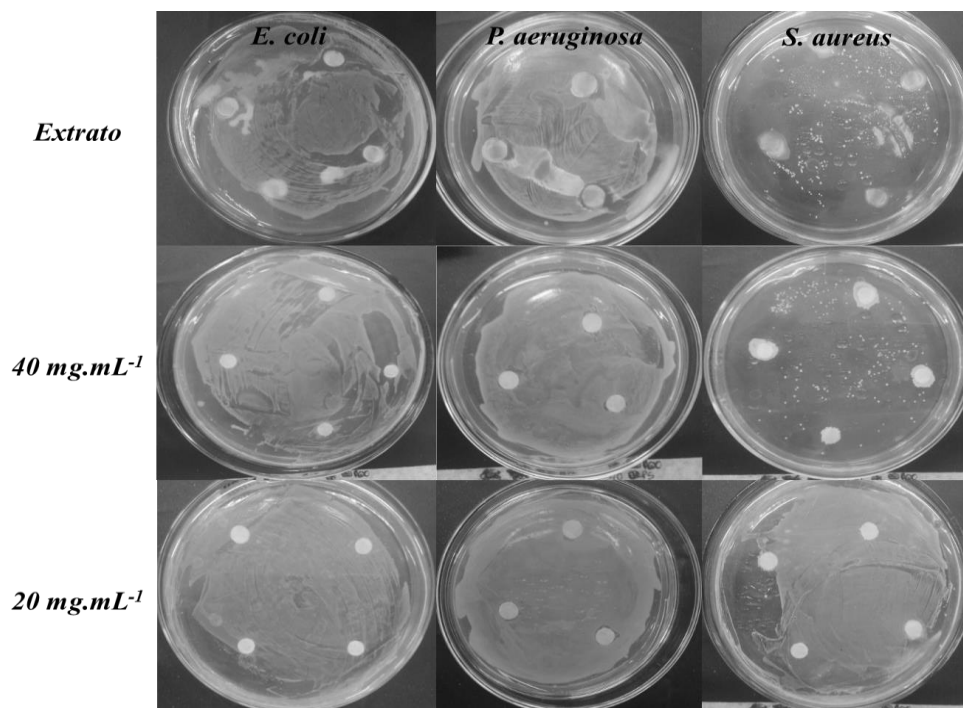
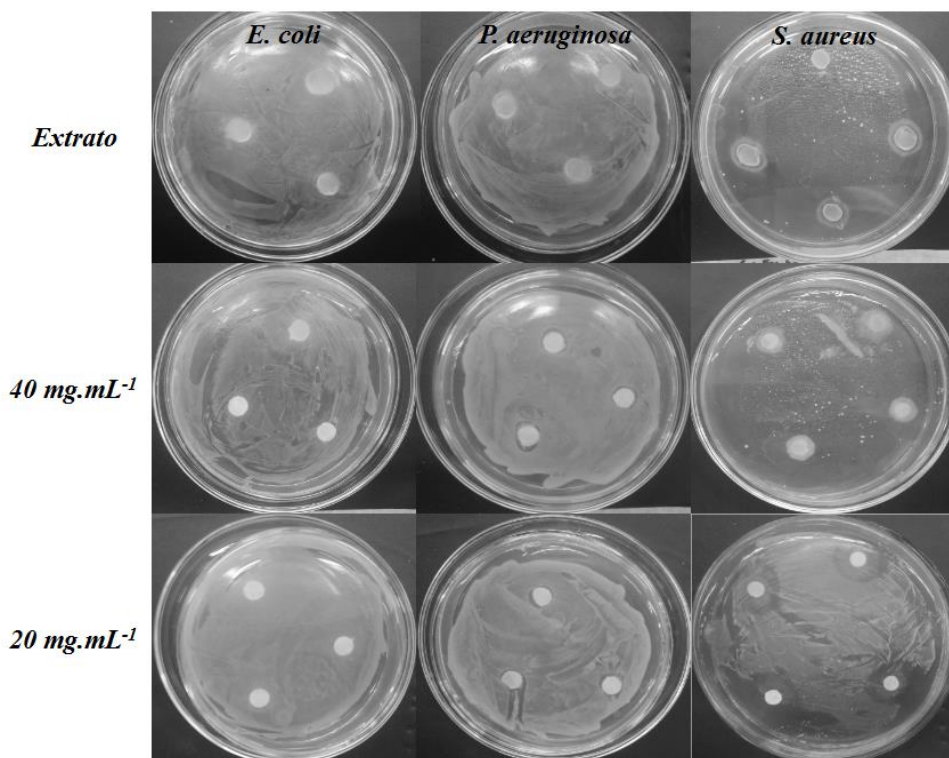
Figura 24 – Atividade antibacteriana do biossurfactante de *C. utilis* em meio suplementado com 6% de óleo de fritura de canola e 6% de glicose

Figura 25 – Atividade antibacteriana do biossurfactante de *S. cerevisiae* em meio suplementado com 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina



Com base na Tabela 10, tanto o biossurfactante produzido por *C. utilis* quanto o de *S. cerevisiae* não exerceu inibição ao crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, com exceção do biossurfactante isolado de *S. cerevisiae*. Já a bactéria mais sensível ao biossurfactante de *S. cerevisiae* foi a Gram-positiva *S. aureus*, enquanto que *P. aeruginosa* (Gram-negativa) foi a única a apresentar sensibilidade ao biossurfactante de *C. utilis*. Os diâmetros dos halos apresentaram diferenças significativas comparando-se tanto os biossurfactantes, como os micro-organismos avaliados.

Em relação à atividade antibacteriana, o biossurfactante de *S. cerevisiae* exerceu maior inibição que o biossurfactante produzido por *C. utilis*, sendo a bactéria gram-positiva *S. aureus* a mais sensível dentre as três avaliadas. Segundo Ostrosky et al. (2008), a concentração inibitória mínima (CIM) é determinada quando a concentração do composto avaliado é capaz de desenvolver halo de inibição do crescimento microbiano maior ou igual a 10 mm de diâmetro. Neste caso, não foi possível determinar a CIM dos biossurfactantes devido ao maior valor de diâmetro ter sido $6,70 \pm 0,21$.

5.2.8 Citotoxicidade

Segundo Mosmann (1983), este método consiste na redução do MTT por meio da atividade mitocondrial succinato desidrogenase presente nas células vivas, resultando em cristais de formazana que se acumulam no interior na célula e absorvem luz no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados de percentagem de inibição obtidos para a concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ambos os biossurfactantes apresentam-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Percentual de inibição dos biossurfactantes de *S. cerevisiae* e *C. utilis* frente as linhagens L929 e RAW 264.7

Produtos teste	% Inibição			
	RAW 264.7	SEM	L929	SEM
Tampão fosfato pH 7,4	20,30	1,61	12,95	4,94
<i>S. cerevisiae</i>	14,78	1,40	9,90	2,54
<i>C. utilis</i>	0,0	0,0	15,83	5,48

SEM = Erro padrão da média.

Conforme os dados obtidos, observou-se que as soluções dos biossurfactantes na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram percentuais de inibição inferiores a 20% frente as linhagens não cancerígenas de fibroblastos de camundongos (L929) e macrófagos de camundongos (RAW 264.7). De acordo com Gomes Silva et al. (2017), percentuais de inibição de 1 a 20% são considerados sem atividade inibitória, sendo assim, os biossurfactantes não apresentam potencial citotóxico frente as linhagens estudadas.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Marques et al. (2009), os quais avaliaram a citotoxicidade utilizando-se este mesmo método frente fibroblastos 3T6 de camundongos de um surfactante produzido por *Rhodococcus* sp. 51T7, observando-se menor toxicidade com relação aos surfactantes sintéticos. Desta forma, os biossurfactante de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentam potencial de aplicação nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BISCOITOS TIPO COOKIE

5.3.1 Propriedades físicas

Após a cocção (Figura 26), as propriedades físicas dos biscoitos foram determinadas, sendo os resultados médios de peso, diâmetro, espessura e fator de espalhamento dispostos na Tabela 12.

Figura 26 – Biscoitos antes e após a cocção. (A): formulação padrão; (B): formulação A *C. utilis*; (C): formulação B *C. utilis*; (D): formulação A *S. cerevisiae*; (E): formulação B *S. cerevisiae*

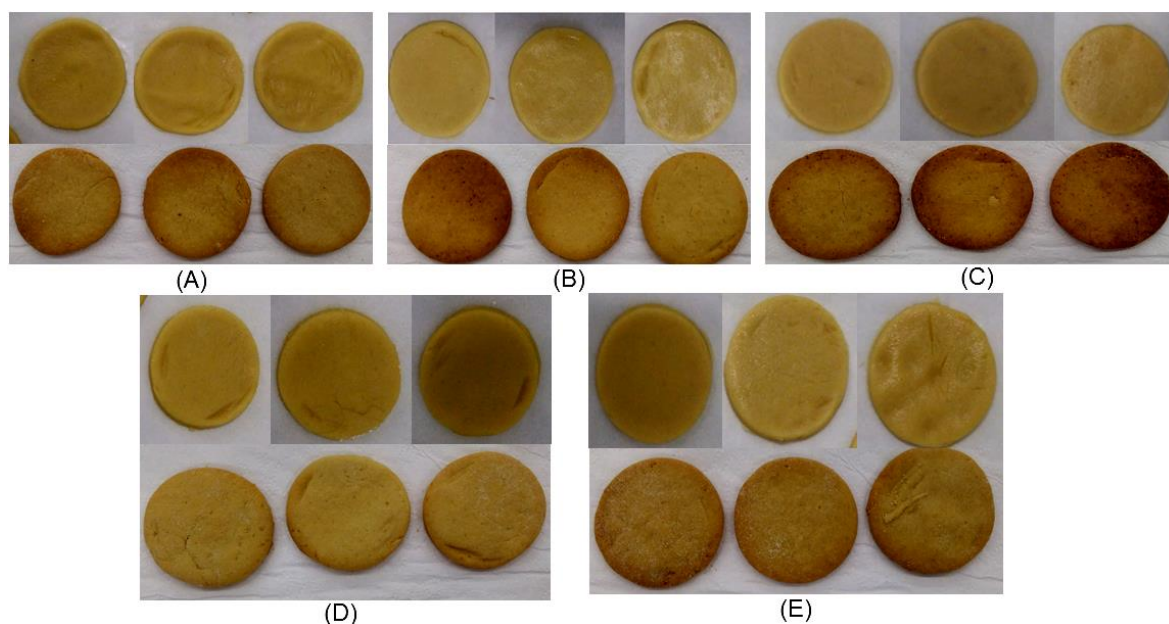


Tabela 12 – Propriedades físicas dos biscoitos após cocção

Micro-organismo	Formulação	Peso (g)	Diâmetro (mm)	Espessura (mm)	Fator de espalhamento
—	Padrão	6,92 ± 0,71 ^a	46,82 ± 0,50 ^a	7,34 ± 0,24 ^a	6,38 ± 0,05 ^a
<i>C. utilis</i>	A	6,38 ± 0,63 ^a	47,42 ± 0,20 ^a	7,65 ± 0,31 ^a	6,20 ± 0,17 ^a
	B	6,54 ± 0,61 ^a	48,19 ± 0,96 ^a	7,64 ± 0,30 ^a	6,32 ± 0,37 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	A	7,08 ± 0,57 ^a	47,39 ± 0,22 ^a	7,33 ± 0,45 ^a	6,47 ± 0,31 ^a
	B	7,13 ± 0,66 ^a	48,80 ± 0,45 ^a	7,64 ± 0,22 ^a	6,38 ± 0,06 ^a

Meios na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Conforme os resultados apresentados, não há diferenças significativas entre as diferentes formulações em relação aos parâmetros avaliados. Desta forma, a substituição parcial e total da gema pasteurizada pelos biossurfactantes não ocasiona em mudanças nas propriedades físicas dos biscoitos, apesar de ter sido observado um aumento no peso com a adição do biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* e aumento do diâmetro com a substituição por ambos os biossurfactantes.

Este aumento de diâmetro está relacionado com o fator de espalhamento, uma característica importante na determinação da qualidade de biscoitos, que por sua vez está altamente correlacionado com a viscosidade da massa. Quanto menor a viscosidade, maior o fator de espalhamento. Além disso, o aumento da concentração de lipídios, ocasionada pela substituição da gema do ovo pelos biossurfactantes, também pode aumentar o fator de espalhamento da massa (ZOUARI et al., 2016).

5.3.2 Análise físico-química

Os resultados obtidos para os teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos, bem como os valores energéticos dos biscoitos estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 – Composição físico-química e valor energético dos biscoitos com e sem adição de biossurfactantes

Parâmetro	Formulação padrão	Formulação A		Formulação B	
		<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Umidade (%)	0,07 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,00 ^{db}	0,03 ± 0,00 ^{edb}
Cinzas (%)	1,53 ± 0,13 ^a	1,72 ± 0,36 ^a	1,67 ± 0,11 ^a	1,70 ± 0,01 ^a	1,60 ± 0,01 ^a
Lipídeos (%)	21,96 ± 1,12 ^a	24,58 ± 1,93 ^a	23,32 ± 0,84 ^a	27,96 ± 2,64 ^a	25,10 ± 1,69 ^a
Proteínas (%)	8,40 ± 0,04 ^a	7,95 ± 0,18 ^b	7,54 ± 0,11 ^c	7,85 ± 0,28 ^b	7,74 ± 0,03 ^d
Carboidratos (%)	68,01 ± 1,31 ^a	66,97 ± 1,14 ^a	65,73 ± 1,80 ^a	65,82 ± 2,56 ^a	62,59 ± 2,66 ^a
Valor energético (cal)	503,27±5,05 ^a	509,55±3,75 ^a	518,97±8,47 ^a	515,90±8,19 ^a	532,94±13,22 ^a

Meios na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Conforme Tabela 13, não houve diferenças significativas entre as formulações quanto aos teores de cinzas, lipídeos e carboidratos, assim como valor energético. Em relação à umidade, todos apresentaram um baixo teor, variando de 0,02 a 0,10%, sendo menor com a substituição da gema pelos biossurfactantes. Em relação ao teor de proteínas, ambas as formulações alternativas apresentaram valores mais baixos que a formulação padrão, que

pode ser devido à ausência deste componente nos biossurfactantes e presença, em menor percentual que na clara, na gema do ovo.

Na elaboração de cookies com diferentes proporções de farinha de trigo com casca de gergelim, Zouari et al. (2016) adicionaram biossurfactante de *Bacillus subtilis* SPB1 de 0,025-0,1% para avaliar a qualidade global do produto. Nas formulações padrão e de diferentes proporções de farinha de trigo/casca de gergelim, sem adição do biossurfactante, os resultados de cinzas e proteínas foram duas a três vezes maiores ao encontrados neste trabalho, ao contrário de gorduras e carboidratos, que foram bem menores, obtendo resultados favoráveis para perfil de textura da massa.

Com relação ao valor energético, mesmo havendo a substituição da gema do ovo pelo biossurfactante, todas as formulações propostas não apresentaram valor energético diferente significativamente. Como a gordura apresenta o maior valor energético de todos os principais constituintes dos alimentos, os teores de lipídios também apresentaram a mesma equivalência entre a formulação padrão e as elaboradas. Alguns autores relatam a substituição da gordura em *muffins* por carboidratos com concomitante redução de cerca de 45% no teor de lipídios e, consequentemente, redução do valor calórico do produto (ZAHN, PEPKE; ROHM, 2010). Zoulias, Oreopoulou e Tzia (2002) demonstraram que a gordura tem papel importante na elaboração de cookies melhorando principalmente as características de textura. Desta forma, uma vez que os biossurfactantes apresentam em sua composição basicamente lipídeos e carboidratos, sua utilização como substituinte da gema do ovo não afeta a composição do produto final.

5.3.3 Análise de Textura dos biscoitos

Os resultados de firmeza, coesividade e elasticidade das 5 formulações da massa antes da cocção e firmeza dos biscoitos após cocção, apresentam-se na Tabela 14.

Tabela 14 – Análise do perfil de textura dos biscoitos antes e após cocção

Formulação	Antes da cocção				Firmeza (N)
	Firmeza (N)	Coesividade	Elasticidade (mm)	Adesividade (mJ)	
Padrão	63,57 ± 2,84 ^a	0,70 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,12 ^a	1,67 ± 0,29 ^a	445,59 ± 15,52 ^a
A (<i>C. utilis</i>)	54,94 ± 3,49 ^b	0,44 ± 0,02 ^b	2,87 ± 0,32 ^b	2,00 ± 0,50 ^a	368,19 ± 7,63 ^b
B (<i>C. utilis</i>)	45,65 ± 2,27 ^{cb}	0,46 ± 0,02 ^{cb}	0,83 ± 0,06 ^{ca}	2,25 ± 0,29 ^{ba}	354,93 ± 14,84 ^{cb}
A (<i>S. cerevisiae</i>)	66,18 ± 3,00 ^{da}	0,72 ± 0,06 ^{da}	0,77 ± 0,12 ^{dca}	1,17 ± 0,29 ^{ca}	427,88 ± 10,71 ^{da}
B (<i>S. cerevisiae</i>)	44,47 ± 6,40 ^{ec}	0,62 ± 0,05 ^{eda}	0,83 ± 0,12 ^{edca}	1,50 ± 0,50 ^a	426,60 ± 12,35 ^{eda}

Meios na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

De acordo com Pereira et al. (2004), a textura é uma das características principais a ser avaliada na análise da qualidade de biscoitos, apresentando notável importância para aceitação de um alimento pelos consumidores. Um dos ingredientes que afeta significativamente a textura é a gordura, oriunda, por exemplo, da gema do ovo, uma vez que afeta a intensidade e percepção das propriedades sensoriais do alimento, como o sabor.

Conforme a Tabela 14 para a massa antes da cocção, a substituição da gema pelos biossurfactantes apresentou diferenças significativas em relação a todos os parâmetros avaliados. Entretanto, a formulação que obteve resultados mais próximos à formulação padrão foi com a substituição pelo biossurfactante produzido por *S. cerevisiae* (menor teor de lipídeos), apresentando maior firmeza e coesividade e menor elasticidade, resultando em um biscoito mais crocante e possivelmente mais mastigável.

Em relação à massa após cocção, não houve diferença significativa da firmeza com a substituição pelo biossurfactante produzido por *S. cerevisiae*. Todavia, a presença do biossurfactante produzido por *C. utilis* resultou numa diminuição significativa, com uma maior diminuição com a substituição total (de 445,59 ± 15,52 N para 354,93 ± 14,84 N). Isto pode ser devido ao teor de lipídeos elevado do biossurfactante substituinte, gerando um produto mais macio e elástico. Resultados semelhantes de firmeza também foram encontrados por Zouari et al. (2016), os quais constataram uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) com a adição de um bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* SPB1 nas concentrações acima de 0,5%. Em contrapartida, obtiveram valores maiores de coesividade e menores de elasticidade com a adição do bioemulsificante.

Em geral, os biossurfactantes apresentaram propriedades funcionais semelhantes à gema do ovo, visto que não houve diferenças muito significativas na análise do perfil de textura da massa antes e após o processo de cocção, em especial com o biossurfactante

produzido por *S. cerevisiae*. Desta forma, é possível substituir a gema do ovo (origem animal) pelos biossurfactantes avaliados, sem prejuízo nas características do produto final.

6 CONCLUSÕES

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* possuem potencial de produção de biossurfactantes com boa atividade tensoativa e emulsificante, utilizando-se resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio;

Os biossurfactantes produzidos por *C. utilis* e *S. cerevisiae* apresentaram, respectivamente, estrutura de um ácido carboxílico e de um glicolípídeo, com valor nutricional agregado;

Os biossurfactantes apresentam estabilidade térmica, podendo ser aplicados em sistemas com temperaturas relativamente altas sem perda significativa de sua massa;

Os biossurfactantes não apresentaram atividade antibacteriana satisfatória frente as bactérias avaliadas;

Os biossurfactantes apresentam potencial de aplicação no setor alimentício por apresentarem capacidade antioxidante e sem potencial citotóxico frente algumas linhagens de células não cancerígenas;

A aplicação dos biossurfactantes como emulsificantes demonstrou propriedades físicas e físico-químicas e perfil de textura compatíveis com a formulação padrão, sendo possível sua utilização em potencial no setor alimentício.

7 PERSPECTIVAS

- Realização de estudo cinético de crescimento da levedura *S. cerevisiae* e de produção do seu respectivo biossurfactante para direcionamento do tempo de obtenção da biomolécula para outras aplicações específicas;
- Estudo da estabilidade dos biossurfactantes frente diferentes condições ambientais como pH (ácidos e básicos) e concentração salina (NaCl);
- Estudo da concentração inibitória mínima dos biossurfactante frente as bactérias avaliadas e outros micro-organismos;
- Aumento da escala de produção em biorreatores;
- Aplicação dos biossurfactantes em outros tipos de alimentos, como derivados lácteos e emulsões gordurosas, substituindo insumos de origem animal;
- Análise sensorial de aceitabilidade dos biscoitos para obtenção de um produto com finalidade comercial.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. A.; AZIZ-UR-REHMAN; MUHMOOD, T.; KHAN, K. M.; ASHRAF, M.; EJAZ, S. A.; ARSHAD, S. Synthesis, Structural Characterization and Biological Screening of Various Sulfa Drugs Derived from 2-Anisidine. **Journal Chemical Society of Pakistan**, v. 35, n. 2, 2013, p. 404-410.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, 2010, p. 1323–1336.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, 1988, p. 589- 601.
- ALMEIDA, D. G.; SILVA, R. C. F. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Response Surface Methodology for Optimizing the Production of Biosurfactant by *Candida tropicalis* on Industrial Waste Substrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 157, 2017, p. 1-13.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 17 ed., Washington, DC: 2002.
- BAKHSHI, N.; SOLEIMANIAN-ZADA, S.; SHEIKH-ZEINODDIN, M. Dynamic surface tension measurement for the screening of biosurfactants produced by *Lactobacillus plantarum* subsp. *Plantarum* PTCC 1896. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 101, 2017, p. 1–8.
- BANDYOPADHYAY, K.; CHAKRABORTY, C.; BHATTACHARYYA, S. Fortification of mango peel and kernel powder in cookies formulation. **Journal of Academia and Industrial Research** (JAIR), v. 12, 2014, p. 661–664.
- BARRIGA, J.A.T.; COOPER, D.G.; IDZIAK, E.S.; CAMERON D.R. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1-2, 1999, p. 96-102.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, 2008, p. 979–985.
- BHATIA, V.; SAHARAN, B. S. Isolation and characterization of glycolipid biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* LF14 isolated from leather factory. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science (IOSI)**. v. 1, n. 2, 2015, p. 22-27.
- BHATIA, V.; SAHARAN, B. S. Isolation and partial Structural & Functional Characterization of Glycolipid Biosurfactant producing *Pichia sorbitophila* WG1 from Rotten Grapes. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, 2016 p. 357-367.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 1959, p. 911-917.

- BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of aqueous and ethanol plant extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, 2014, p. 218-225.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J.C.; GERDS, M.L.; HAMMES, W.P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I.B.; PRAJAPATI, J.B.; SETO, Y.; TER SCHURE, E.; VAN BOVEN, A.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E.B. Microbial production and application of sophorolipids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, 2012, p. 87-97.
- BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O.T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, 2005, p. 6-15.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, 1995, p. 25-30.
- BRASIL. Decreto nº 79.094, de 05 de janeiro de 1977. Brasília, DF, 05 jan. 1977.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 263, de 22 de setembro de 2005. Brasília, DF, 22 set. 2005.
- CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, 1988, p. 1420-1425.
- CAMPOS, J. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R.D.; BANAT, I.M. Use of **(bio)surfactants in foods**. In: Biotechnological Production of Natural Ingredients for Food Industry. BICAS, J.L.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G.M. (Eds). Bentham Science Publishers. 1 ed., v. 1. n. 11, 2016, p. 435-459.
- CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, 2013, p. 1097-1108.
- CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, 2014, p. 3234 – 3252.
- CAMPOS, J.M.; STAMFORD, T.L.M.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; STAMFORD, T.C.M.; SARUBBO, L.A. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. **Toxicology Reports**, v.2, 2015, p. 1164-1170.
- CARRILHO, M.; SIEBE, C.; DALKMANN, P.; SIEMENS, J. Competitive sorption of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) surfactants and the antibiotics sulfamethoxazole and

ciprofloxacin in wastewater-irrigated soils of the Mezquital Valley, Mexico. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, n. 9, 2016, p. 2186–2194.

CHAPRÃO, M. J.; FERREIRA, I. N. S.; CORREA, P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, E. J.; SARUBBO, L. A. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, 2015, p. 471–479.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 9^o ed, Wayne, CLSI document M02-A10, 2009.

DASGUPTA, N. B. Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro. **Food Chemistry**, v. 88, 2004, p. 219-224.

DERGUINE-MECHERI, L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; KHEMILI-TALBI, S.; DJENANE, D. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic *Cryptococcus strain* YLF isolated from crude oil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 162, 2018, p. 712-724.

[Dissertação] CAMPOS, R. L. V. G. **Superprodução de Ramnolípídeo em *Saccharomyces cerevisiae*: construção de vetores de expressão**. Universidade Católica de Brasília, 2015, 65 p.

EKPENYONG, M. G.; ANTAL, S. P.; ASITOK, A. D.; EKPO, B. O. Plackett-Burman Design and Response Surface Optimization of Medium Trace Nutrients for Glycolipopeptide Biosurfactant Production. *Iranian Biomedical Journal*, v. 21, n. 4, 2017, p. 249-260.

ELSHAFIE, A. E.; JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BEMANI, A. S.; AL-BAHRY, S. N.; AL-MAQBALI, D.; BANAT, I. M. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

FARIQ, A.; SAEED, A. Production and Biomedical Applications of Probiotic Biosurfactants. **Current Microbiology**, v. 72, 2016, p. 489–495.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 2008, p. 2091-2099.

FROST, D. J.; ADHIKARI, K.; LEWIS, D. S. Effect of barley flour on the physical and sensory characteristics of chocolate chip cookies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, 2011, p. 569–576.

GIRI, S. S.; SEN, S. S.; JUN, J. W.; SUKUMARAN, V.; PARK, S. C. Role of *Bacillus licheniformis* VS16-Derived Biosurfactant in Mediating Immune Responses in Carp Rohu and its Application to the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017, p. 2-13.

GOMES SILVA, J. A.; SILVA, G. C.; FARIAS SILVA, M. G.; FARIAS DA SILVA, V.; AGUIAR, J. S.; GONÇALVES DA SILVA, T.; LEITE, S. P. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth

(Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, 2017, p. 321-326.

GUAN, Z.; TANG, X.; NISHIMURA, T.; HUANG, Y.; REID, B. J. Adsorption of linear alkylbenzene sulfonates on carboxyl modified multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, n. 15, 2017, p. 205-214.

GUSMÃO, C. A. B.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, 2010, p. 1683–1692.

HAN, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, 2015, p. 230–237.

IONASHIRO, M.; **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**, Giz Editorial: São Paulo, 2005.

IRORERE, V. U.; TRIPATHI, L.; MARCHANT, R.; MCCLEAN, S.; BANAT, I. M. Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 101, 2017, p. 3941–3951.

JOHNY, J. M. Inhibitory effect of biosurfactant purified from probiotic yeast against biofilm producers. **Journal of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)**, v. 6, n. 1, 2013, p. 51-55.

KIELISZEK, M.; KOT, A. M.; BZDUCHA-WRÓBEL, A.; BŁAZEJAK, S.; GIENTKA, I.; KURCZ, A. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal biology reviews**, v. 31, 2017, p. 185-198.

KOURMENTZA, C.; COSTA, J.; AZEVEDO, Z.; SERVIN, C., GRANDFILS, C.; DE FREITAS, V.; REIS, M. A. M. *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. **Bioresource Technology**, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.138>.

LIMA, R. A.; ANDRADE, R. F. S.; RODRÍGUEZ, D. M.; ARAÚJO, H. W. C.; SANTOS, V. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 6, 2017, p. 237-244.

LOPES, M. R. V.; AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M. S. F.; JORGE, N.; RUVIERI, V. Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, 2004, p. 168-176.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. A.T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, 2015, p. 413–418.

- LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, 2013, p. 202– 209.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995. **Current Microbiology**, v. 62, 2011, p. 1527–1534.
- LUNA, J.M.; SANTOS FILHO, A.S.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A. Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, 2016, p. 583-588.
- LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, 2009, p. 785–793.
- LUO, X.; ZHOU, Y.; BAI, L.; LIU, F.; ZHANG, R.; ZHANG, Z.; ZHENG, B.; DENG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Production of highly concentrated oil-in-water emulsions using dual-channel microfluidization: Use of individual and mixed natural emulsifiers (saponin and lecithin). **Food Research International**, v. 96, 2017, p. 103–112.
- LÜPKE, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 23, 1985, p. 287–291.
- MADDIKERI, G. L.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, v. 263, 2015, p. 479–487.
- MARQUES, A.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.; TERUEL, J.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 158, 2009, p. 110-117.
- MCCLEMENTS, D.J.; GUMUS, C.E. Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 234, 2017, p. 3-26.
- MNIF, I.; BESBES, S.; ELLOUZE, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Improvement of bread quality and bread shelf-life by *Bacillus subtilis* biosurfactant addition. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, 2012, p.1105–1112.
- MNIF, I.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 4, 2017, p. 1-15.
- MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Analysis of expressed sequence tags from the anamorphic basidiomycetous yeast, *Pseudozyma antarctica*,

wich produces glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 23, 2003, p. 661-671.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, 1983, p. 55-63.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 70, n. 1, 2004, p. 31-55.

NAJMI, Z.; EBRAHIMPOUR, G.; FRANZETTI, A.; BANAT, I. M. In Situ Downstream Strategies for Cost-Effective Bio/Surfactant Recovery. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, 2018. DOI: 10.1002/bab.1641.

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

NOOR AZIAH, A. A.; MOHAMAD NOOR, A. Y.; HO, L.-H. Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flour. **International Food Research Journal**, v. 19, 2012, p. 1539–1543.

OLIVEIRA, I. V.; BERNARDES, A. L.; VIMERCATI, W. C.; LUCIA, S. M. D.; COSTA, A. G. V. Estudo de mercado de biscoito tipo cookie integral adicionado de goma de linhaça dourada. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, 2016.

OLIVEIRA, D. W. F., FRANC, I. W. L., FÉLIX, A. K. N., MARTINS, J. J. L., GIROA, M. E. A., MELO, V. M. M. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew Apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, 2013, p. 34–43.

OLIVEIRA, J. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, 2013, p. 155–160.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008, p. 301-307.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, 2011, p. 633-654.

PEREIRA, J.; CIACCO, C. F.; VILELA, E. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Função dos ingredientes na consistência da massa e nas características do pão de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, 2004, p. 494-500.

PERFUMO, A.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (Bio)availability of hydrophobic substrates. In: *Cellular ecophysiology of microbe, Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, AG, T. Krell (ed.), Springer, 2017, p. 1-29. ISBN 9783319505404.

- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, 1999, p. 337–341
- PRASANNA, P. H. P.; BELL, A.; GRANDISON, A. S. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, 2012, p. 533–540.
- RADZUAN, M. N.; BANAT, I. M.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, 2017, p. 99–105.
- RANE, A.N.; BAIKAR V. V.; KUMAR, V. R.; DEOPURKAR, R. L. Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and Its Application in Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017, p. 1-12.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, 1999, p. 1231–1237.
- RIENZO, M. A. D.; BANAT, I. M.; DOLMAN, B.; WINTERBURN, J.; MARTIN, P. J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, 2015, p. 720-726.
- RIENZO, M. A. D.; STEVENSON, P. S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. P. aeruginosa biofilm disruption using microbial biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, 2016, p- 868–876.
- ROCHA E SILVA, F. C. P.; ROQUE, B. A. C.; ROCHA E SILVA, N. M. P.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions. **AMB Express**, v. 7, 2017, DOI: 10.1186/s13568-017-0499-6.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 2007, 4 p.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, 2014, p. 34–38.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; MARINHO, P. H. C.; FARIAS, C. B. B.; FERREIRA S. R. M.; SARUBBO, L. A. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, 2013, p. 117–122.
- SANTOS, A. C.; BEZERRA, M. S.; PEREIRA, H. S.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Production and recovery of rhamnolipids using sugar cane molasses as carbon source.

Journal of Chemical & Engineering, v. 4, 2010, p. 1–27.

SANTOS, D. K. F.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, 2016, p.401-430.

SANTOS, D. K. F.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, v. 8, 2017, p. 1-11.

SANTOS, D. K. F., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, 2013, p. 4–50.

SANTOS, A. P. P.; SILVA, M. D. S.; COSTA, E. V. L.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; RAMOS, C. S.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 51, n. 2, 2018, p. 1-10.

SARABHAI, S.; INDRANI, D.; VIJAYKRISHNARAJ, M.; MILIND, V.; KUMAR, A.; PRABHASANKAR, P. Effect of protein concentrates, emulsifiers on textural and sensory characteristics of gluten free cookies and its immunochemical validation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, 2014, p. 3763-3772.

SARUBBO, L. A.; ROCHA JUNIOR, R. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, 2015, p. 707-723.

SHAH, M. U. H.; SIVAPRAGASAM, M.; MONIRUZZAMANA, M.; TALUKDER, MD. M. R.; YUSUP, S. BT.; GOTO, M. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, 2017, p. 60–67.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. **Biotechnology Reports**, v. 11, 2016, p. 27–35.

SELVAKUMAR, K.; ANIBABIYANS, R.; MADHAN, R. Extracellular glycolipids from *Saccharomyces cerevisiae* as bioemulsifying agents in food processing. **Innovare Journal of food science**, v. 4, n. 1, 2016, p. 3-6.

SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; MEIRA, H. M.; SILVA, E. J.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, 2017, p. 206-215.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, 2010, p. 174-183.

SILVA, R. C. F. S., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., FARIAS, C. B. B., FILHO, H. J. B., SANTOS, V. A. Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 50, 2013, p. 137-142.

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

SOLOMON, O. B.; OLUWAFEMI, O. A.; MUKTAR, A. G.; MOHAMMED, S. A.; CLETUS, I. C.; TIMOTHY, A. T. Production and Characterization of Biosurfactants by *Candida boleticola* H09 and *Rhodotorula bogoriensis* H15 for Crude Oil Recovery and Cleaning of Oil Contaminated Fabrics. *International Journal of Life Sciences and Technology*, v. 10, n. 15, 2017, p. 109-123.

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

SRIDHAR, B.; KARTHIK, R.; PUSHPAM, A. C.; VANITHA, M. C. Production and purification of biosurfactants from *saccharomyces cerevisiae* and *pseudomonas aeruginosa* and its application on fruit salads. **International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology**, v. 6, n. 10, 2015, p. 97-104.

TURNES, J. M.; BONETTI, A. F.; KRAUSE, M. S.; CANTELI, V. C. D.; PAULA, C. S.; DUARTE, M. R.; ZANIN, S. M. W.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., *Rutaceae*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, 2014, p. 459-467.

VADIVEL, V.; BIESALSKI, H. K. Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. Pierre seeds. **Process biochemistry**, v. 46, 2011, p. 1973-1980.

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, 2006, p. 604-620.

VECINO, X.; BARBOSA-PEREIRA, L.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, 2014, p. 313-320.

WILLIAMS, W.; TRINDADE, M. T.C. **Functional Metagenomics: Tools and Applications**. Springer International Publishing AG, T.C. Charles, M. R. Liles, A. Sessitsch (eds.), 2017, 253 p.

ZAHN, S.; PEPKE, F.; ROHM, H. Effect of inulin as a fat replacer on texture and sensory properties of muffins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, 2010, p. 2531–2537.

ZOUARI, R.; BESBES, S.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Cookies from composite wheat–sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. **Food Chemistry**, v. 194, 2016, p. 758–769.

ZOULIAS, E.I.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C. Textural properties of low-fat cookies containing carbohydrate- or protein-based fat replacers. **Journal of Food Engineering**, v. 55, 2002, p. 337–342.