



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DAYANA PINTO DE MENESES

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aureobasidium thailandense*
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

FORTALEZA

2016



DAYANA PINTO DE MENESES

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aureobasidium thailandense*
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sueli Rodrigues.
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Ligia Rodrigues

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- M499p Meneses, Dayana Pinto de.
Produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense* utilizando resíduos agroindustriais /
Dayana Pinto de Meneses. – 2016.
72 f. : il. color. enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.
Coorientação: Profa. Dra. Ligia Rodrigues.

1. Engenharia química. 2. Biossurfactantes. 3. Agroindústria - Resíduos. I. Título.

DAYANA PINTO DE MENESES

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aureobasidium thailandense*
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 22 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)



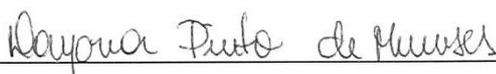
Prof. Dr. João Benevides Pessela
Universidade Autónoma de Madrid (UAM)

Declaração de Originalidade

Fortaleza, 22 de Fevereiro de 2016.

Eu, **Dayana Pinto de Meneses**, declaro, para os devidos efeitos, que o meu trabalho, intitulado “**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Aureobasidium thailandense* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS** “ executado no âmbito do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, orientado pela Professora Sueli Rodrigues, é um trabalho original, fruto das minhas pesquisas e investigações.

Declaro, ainda, que citei e referenciei todos os autores e documentos por mim utilizados na produção do trabalho. As frases ou parágrafos retiradas de trabalhos ou obras de outros autores (adaptadas ou não) e citadas neste trabalho estão assinaladas entre aspas e devidamente referenciadas, de acordo com as normas requeridas. Declaro, também, que estou ciente de que o plágio – a utilização de partes de um trabalho alheio não devidamente referenciadas – pode resultar na anulação deste trabalho.



Dayana Pinto de Meneses

A Deus.

Aos meus pais, Benício e Eugênia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua infinita misericórdia, cuja minha vida encontra todo sentido.

À minha família, pelo cuidado e amor.

À Simone Lopes, por sua disposição em ensinar-me quando trabalhei em seu Doutorado. E por sua amizade e sabedoria me ensinando que o sentido da vida profissional não se encerra nela mesma, mas é parte de um todo.

À Soraya Sancho, pela amizade, dedicação e carinho. Muito obrigada por partilhar seus dons.

À Ana Raquel, por sua amizade que me educa e impulsiona para buscar valores eternos.

À Tatiane Maciel, pela convivência profissional e cotidiana. Obrigada por tua companhia, amizade e cumplicidade.

À Niédila Afonso, sua alegria, entusiasmo e inteligência contribuíram muito para a finalização deste trabalho.

À Nair Sampaio, sua perseverança foi testemunho para minha profissionalização. Obrigada por seu carinho.

À Cris Rabelo, por sua disposição e ajuda sempre que precisei. Obrigada por sua amizade.

À Tatiane Nunes, pela sua dedicação no início desse projeto, partilhando sua experiência profissional.

À Lívia Nery, por partilhar sua vida pessoal e profissional em Portugal. Ajudando-me durante a finalização do trabalho.

À Maria de Fátima, por teu carinho e amizade. Sua amizade e carinho em Portugal alegraram nossa rotina de trabalho.

Ao Eduardo Gudiña, por sua ajuda profissional e cuidado para a realização dos experimentos. Obrigada pela dedicação!

À Sara Silvério, sua receptividade em Portugal foi valiosa. Muito obrigada pelo carinho e amizade.

Ao grupo de pesquisadoras da Universidade do Minho: Ana Rodrigues, Rita Martins, Andrea Santos, Rutilene, Xanel, Aloia, Clarisse Nobre, Lina Fernandes, Karla Texeira, Karol Caitano, Taciana e Meyrielle. Muito obrigada pela amizade e carinho, todas contribuíram generosamente doando sua inteligência e tempo.

À Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues, pela sua paciência e incentivo. Muito obrigada por sua dedicação profissional e empenho para a realização desse trabalho.

À Profª. Drª. Lígia Rodrigues, por sua contribuição profissional. Sua atenção e paciência foram valorosas para o desenvolvimento desse trabalho.

À Profª. Drª. Valdevez Rocha, por sua participação na qualificação desse trabalho. Suas correções foram valiosas para a melhoria da discussão e organização dos resultados. Muito obrigada!

À Profª. Drª. Luciana Gonçalves, por sua contribuição na qualificação e defesa desse trabalho. Sua experiência profissional contribuiu para a organização e apresentação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Benevides C. Pessela, pela disposição em participar da banca de defesa desse projeto. Muito obrigada.

À Universidade Federal do Ceará pela formação acadêmica.

Ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela colaboração no desenvolvimento científico desse trabalho. Muito obrigada!

À CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. Ao CNPq pela bolsa do Programa Ciências sem Fronteira, financiando o avanço das pesquisas de Mestrado no exterior.

“Nada te perturbe, nada te espante.
Tudo passa, Deus não muda. Quem a
Deus tem, mesmo que passe por
momentos difíceis. Sendo Deus o seu
tesouro, nada lhe falta.

Só Deus basta!”

(Santa Tereza D’Ávila)

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que atuam na redução da tensão superficial e interfacial de líquidos. São produzidos por uma diversidade de microrganismos, em sua maioria por bactérias e leveduras. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense* isolado do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio a partir do processo de fermentação submersa. Os primeiros experimentos foram realizados a fim de selecionar as fontes de nutrientes a partir: melão, água residual da produção de azeite (*olive mill wastewater* - OMW), glicose, extrato de levedura e água de maceração de milho (CSL). A partir desse estudo preliminar foi realizado um fatorial fracionado 2^{3-1} , incluindo 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios para selecionar a fonte de nitrogênio (CSL e extrato de levedura). O CSL obteve efeito negativo na produção do biossurfactante. Dessa forma pode-se realizar um planejamento fatorial completo (DCCR- 2^2) para otimizar as concentrações de extrato de levedura e de OMW. Os valores obtidos para redução de tensão superficial do caldo fermentado foram $27 \pm 2,5$ mN/m e $28 \pm 2,6$ mN/m em 24 e 48 h, respectivamente e os estimados pelo planejamento foram de 27 mN/m (24 horas) e 28,2 mN/m (48 horas). Dessa forma o meio de fermentação foi otimizado nas seguintes concentrações: 2 g/L de extrato de levedura, 1,5% (v/v) de OMW, 6 g/L de glicose e 1 g/L KH_2PO_4 . O biossurfactante produzido por *A. thailandense* apresentou uma concentração micelar crítica (CMC) de 550 mg/L, reduzindo a tensão superficial da água de $72 \pm 0,8$ mN/m para 33 mN/m. A estrutura da molécula não foi completamente elucidada, sabe-se que a cadeia carbônica $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} -$ liga-se a uma porção éster. A ação emulsificante foi comparada ao surfactante sintético SDS ($E_{24} = 57 \pm 0,57$ %) na concentração de 10 mg/mL, obtendo um E_{24} de $49 \pm 0,4$ %. O surfactante produzido por *A. thailandense* promoveu a dispersão de 86% do petróleo bruto em placa e após 24 horas sua ação manteve-se estável, o surfactante SDS não apresentou a dispersão nesse mesmo intervalo de tempo.

Palavras-chave: Biossurfactante. *Aureobasidium thailandense*. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Biosurfactants are natural amphipathic molecules thus they can reduce the surface and interfacial tensions. They are produced by a variety of microorganisms, mostly by bacteria and yeasts. The aim of this study was to evaluate the biosurfactant production from the submerged fermentation process by *Aureobasidium thailandense*, isolated from *Cashew stalk* (*Anacardium occidentale* L.) using organic residues as carbon and nitrogen source. The first experiments were conducted in order to select the sources of nutrients from the following sources: molasses, waste water from the production of olive oil (olive mill wastewater - OMW), glucose, yeast extract and corn steep liquor (CSL). The study conducted using a fractional factorial 2^{3-1} to analyze the effect of nitrogen sources (yeast extract and corn steep liquor) and olive mill wastewater concentrations in the medium. CSL obtained negative effect on the production of the biosurfactant. A central composite rotated design (CCRD - 2^2) including 4 trials in the axial conditions and three repetitions at the central point, was performed to optimize the yeast extract and olive mill wastewater concentration. The real values obtained from fermentation using the concentrations of 2 g/L of yeast extract, 1.5% (v/v) of OMW, 6 g/L of glucose and 1 g/L of KH_2PO_4 were 27 ± 2.5 mN/m and 28 ± 2.6 mN/m at 24 and 48 h, respectively. The maximum reduction in surface tension values of the fermentation broth generated were estimated at 27 mN/m (24 hours) and 28.2 mN/m (48 hours). The biosurfactant produced by *A. thailandense* showed a critical micellar concentration (CMC) of 550 mg/L, reducing the water surface tension from 72 ± 0.8 mN/m to 33 mN/m. The structure of the molecule represents $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} -$, where its ester portion has not yet been identified. The emulsifying ability was verified comparing the produced surfactant against the synthetic surfactant SDS ($E_{24} = 57 \pm 0.57\%$) at 10 mg/mL. It was obtained a $E_{24} = 49 \pm 0.4\%$. The surfactant produced by *A. thailandense* caused a 86% dispersion of crude oil in plate and its action after 24 hours remained stable, SDS surfactant showed no dispersion in the same time interval.

Keywords: Biosurfactants. *Aureobasidium thailandense*. Low cost substrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Acumulação de biossurfactantes na interface entre líquido e ar	19
Figura 2	- A relação entre a concentração de biossurfactantes, tensão superficial e a formação de micelas	20
Figura 3	- Estudo do pré-inóculo (a) e inóculo (b) de <i>Aureobasidium thailandense</i> em caldo YPD em <i>shaker</i> a 200 rpm e 28 °C	43
Figura 4	- Diagrama de Pareto com o efeito estimado das fontes de nitrogênio e carbono na produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i>	48
Figura 5	- Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização das concentrações de extrato de levedura e OMW para produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> em 24 horas	52
Figura 6	- Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização das concentrações de extrato de levedura e OMW para produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> em 48 horas	52
Figura 7	- Tensão superficial em função do logaritmo da concentração de biossurfactante produzido por <i>A. thailandense</i>	55
Figura 8	- Espectro de FTIR do biossurfactante produzido por <i>A. thailandense</i>	56
Figura 9	- Espectrograma de massa do biossurfactante produzido por <i>A. thailandense</i>	57
Figura 10	- Ressonância magnética nuclear (RMN) do biossurfactante produzido por <i>A. thailandense</i>	57
Figura 11	- Índice de emulsão ($E_{24\%}$) do biossurfactante bruto produzido por <i>A. thailandense</i> comparando sua ação com SDS	59
Figura 12	- Teste de dispersão do petróleo bruto utilizando biossurfactante produzido por <i>A. thailandense</i> (a,b,c) e SDS (d,e,f)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética	20
Tabela 2	- Classificação dos biossurfactantes e os microrganismos produtores....	22
Tabela 3	- Microrganismos produtores de biossurfactantes	24
Tabela 4	- Substratos de baixo custo utilizados para a produção de biossurfactantes	28
Tabela 5	- Vantagens e desvantagens do uso de substratos de baixo custo na produção de biossurfactantes	28
Tabela 6	- Métodos de recuperação de biossurfactantes	31
Tabela 7	- Composição do meio de cultura para triagem da levedura produtora de biossurfactante	34
Tabela 8	- Perfil dos ácidos graxos da água residual da produção de azeite (OMW)	35
Tabela 9	- Composição dos meios de fermentação para produção de biossurfactantes	36
Tabela 10	- Fatorial fracionado (2^{3-1}) para selecionar as variáveis mais significativas segundo seus efeitos	37
Tabela 11	- Planejamento completo para otimização do meio de cultura (DCCR- 2^2)	37
Tabela 12	- <i>Screening</i> para seleção de levedura produtora de biossurfactante realizada em <i>skaker</i> orbital por 144 horas	42
Tabela 13	- Produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> em meio fermentativo composto por melão (6 g/L) e azeite de oliva (2% v/v) como fonte de carbono	45
Tabela 14	- Produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> em meio fermentativo composto por glicose (6 g/L) e azeite de oliva (2% v/v) como fonte de carbono, água de maceração do milho (3 g/L) como fonte de nitrogênio	45
Tabela 15	- Produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> em meio fermentativo composto por glicose (6 g/L) e água residual da produção de azeite (2% v/v) como fonte de carbono	46
Tabela 16	- Produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> em meio	

	fermentativo composto por melaço (6 g/L), água residual da produção de azeite (2% v/v) e água de maceração de milho (3 g/L)....	47
Tabela 17 -	Valores utilizados no fatorial fracionado (2^{3-1}) para selecionar as variáveis segundo seus efeitos e seus resultados para a redução da tensão superficial do caldo fermentado por <i>A. thailandense</i> em 48 horas	48
Tabela 18 -	Valores do planejamento composto central (2^2) para produção de emulsão (n-hexadecano) por <i>A. thailandense</i> durante 48 horas de fermentação	49
Tabela 19 -	Valores do planejamento composto central (2^2) e resultados obtidos de tensão superficial do meio de fermentação para produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i> durante 48 horas de fermentação.	50
Tabela 20 -	ANOVA para produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i>	51
Tabela 21 -	Composição do meio de fermentação otimizado para a produção de biossurfactante por <i>A. thailandense</i>	53
Tabela 22 -	Resultados da validação do planejamento experimental (DCCR)	54
Tabela 23 -	Avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por <i>A. thailandense</i>	58
Tabela 24 -	Diâmetro da zona clara obtida a partir da dispersão do petróleo bruto após adição do agente tensoativo (10 mg/mL)	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIORÁFICA.....	19
2.1	Surfactantes.....	19
2.2	Biossurfactantes.....	21
2.3	Classificação dos biossurfactantes.....	21
2.3.1	<i>Glicolípídeo.....</i>	22
2.3.2	<i>Lipopeptídeo e lipoproteína.....</i>	23
2.3.3	<i>Ácidos graxos e fosfolípídeo.....</i>	23
2.3.4	<i>Surfactantes Poliméricos.....</i>	24
2.4	Microrganismos produtores de biossurfactantes.....	24
2.4.1	<i>Aureobasidium thailandense.....</i>	25
2.5	Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes.....	25
2.5.1	<i>Resíduos de baixo custo como matéria-prima para a produção de biossurfactantes.....</i>	27
2.6	Aplicação dos biossurfactantes.....	29
2.6.1	<i>Indústria Petroquímica.....</i>	29
2.6.2	<i>Indústria de Alimentos.....</i>	29
2.6.3	<i>Outras aplicações.....</i>	30
2.8	Métodos de recuperação do biossurfactante.....	31
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Seleção da cepa produtora de biossurfactante.....	34
4.2	Microrganismo.....	34
4.3	Preparo do inoculo.....	35
4.4	Produção do biossurfactante.....	35
4.4.1	<i>Estudo das fontes de carbono e nitrogênio.....</i>	35
4.4.2	<i>Otimização do meio de cultura.....</i>	36
4.5	Métodos analíticos.....	37
4.5.1	<i>Determinação de açúcar redutor.....</i>	37

4.5.2	<i>Avaliação da biomassa</i>	38
4.5.3	<i>pH</i>	38
4.5.4	<i>Contagem de células viáveis</i>	38
4.5.5	<i>Determinação da tensão superficial</i>	38
4.5.6	<i>Determinação do índice de emulsificação</i>	39
4.5.7	<i>Caracterização das águas residuais da produção de azeite</i>	39
4.5.8	<i>Método de extração do biossurfactante</i>	40
4.5.9	<i>Determinação da concentração micelar crítica (CMC)</i>	40
4.5.10	<i>Caracterização do biossurfactante bruto</i>	40
4.5.10.1	<i>Análise de Fourier espectrometria de infravermelho (FT-IR)</i>	40
4.5.10.2	<i>Espectrometria de massa</i>	41
4.5.10.3	<i>Ressonância magnética nuclear</i>	41
4.5.11	<i>Ánalise de dispersão em petróleo bruto</i>	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Seleção da cepa produtora de biossurfactante	42
5.2	Preparo do inoculo	42
5.3	Composição do meio de fermentação a partir de resíduos de baixo custo	44
5.4	Otimização da composição do meio de fermentação	47
5.4.1	<i>Planejamento experimental para otimização do meio de cultura</i>	49
5.5	Caracterização do biossurfactante	54
5.5.1	<i>Concentração micelar crítica (CMC)</i>	54
5.5.2	<i>Fourier espectrometria de infravermelho (FT-IR), Espectrograma de massa e Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	55
5.6	Aplicação do biossurfactante	58
6	CONCLUSÃO	62
	PERSPECTIVAS FUTURAS	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que atuam na redução da tensão superficial e interfacial de líquidos. Essas propriedades permitem a sua aplicação em diversas áreas comerciais, entre elas as indústrias alimentícia, farmacêutica, petroquímica, agrícola e de cosméticos (SAKTHIPRIYA *et al.*, 2015; AL-WAHAIBI *et al.*, 2014). O mercado global foi avaliado em 12,7 milhões de dólares em 2012 e deve chegar a 17,1 milhões de dólares em 2020, expandindo a uma taxa anual média de 4% (RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

Uma diversidade de microrganismos, em sua maioria bactérias (*Pseudomonas* e *Bacillus*), leveduras (*Candida*) e, em menor quantidade, os fungos filamentosos são responsáveis pela obtenção dos biossurfactantes (SAKTHIPRIYA *et al.*, 2015; AL-WAHAIBI *et al.*, 2014). As leveduras possuem uma vantagem frente às bactérias, pois em sua maioria são organismos com *Status Generally Regarded as Safe* (GRAS) e, portanto, não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade para aplicação em indústria alimentícia e farmacêutica (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). A levedura *Aureobasidium* sp. é conhecida pela síntese de enzimas e óleos extracelulares, a espécie *Aureobasidium thailandense* não foi reportada por outros estudos como produtora de biossurfactantes.

Os biossurfactantes possuem relevantes vantagens sobre os surfactantes de origem petroquímica, sendo as suas principais características a biodegradabilidade, estabilidade e o fato de conseguirem atuar sobre condições extremas de pH, temperatura e salinidade (HASSAN *et al.*, 2016). No entanto, o custo do processo fermentativo é considerado o principal entrave para o aumento de mercado dos biossurfactantes. A substituição de nutrientes sintéticos por produtos e/ou subprodutos da indústria alimentícia tem se mostrado uma alternativa viável, pois a matéria-prima representa cerca de 30% do custo total da produção (BANAT *et al.*, 2014).

O azeite de oliva é um produto agrícola que possui alta produção no Mediterrâneo, os países com produção mais relevante são: Espanha, Itália e Portugal (abrange 2% da produção mundial). Durante extração do azeite é gerado um grande volume de resíduo líquido, conhecido como água residual da produção de azeite (*olive mill wastewater*), esse subproduto contém em sua composição açúcares, lípidos e compostos aromáticos (ABRUNHOSA *et al.*, 2013 e MATEO *et al.*, 2015). Essas

propriedades permitem uma larga aplicação em processos biotecnológicos, como por exemplo, na produção de enzimas microbianas (Mann *et al.*, 2015), antioxidantes (Abdel-Shafy *et al.*, 2015) e biossurfactantes (MAASS *et al.*, 2015). Outro resíduo utilizado como suplemento em meios de cultura é a água de maceração do milho, por ser fonte de aminoácidos, vitaminas e polipeptídios, é considerada uma boa fonte de nitrogênio orgânico (LIU *et al.*, 2015). O melaço é um subproduto da refinaria de açúcar, contém cerca de 50% de sacarose e outros compostos, tais como sais e ácidos orgânicos (MIRONCZUK *et al.*, 2015).

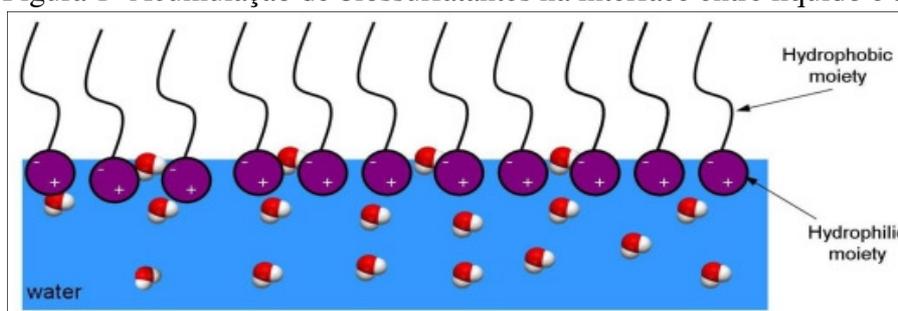
O isolamento de novas culturas permite o estudo de novas biomoléculas, bem como a utilização de substratos de baixo-custo e otimização do processo fermentativo tornam a produção menos onerosa. Dessa forma, o estudo realizou previamente um *screening* a partir de 6 cepas de *Aureobasidium* sp. isoladas de resíduos agroindustriais a fim de avaliar seu potencial na produção de biossurfactantes. A levedura *Aureobasidium thailandense* foi selecionada para avançar nos experimentos, utilizando os resíduos de água de maceração de milho, melaço e água residual da produção de azeite como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. Após selecionar as fontes adequadas para a melhor produção do surfactante, foi realizada a otimização da concentração do meio de cultura a partir do planejamento fatorial completo (DCCR).

2 REVISÃO BIBLIORÁFICA

2.1 Surfactantes

As moléculas de surfactantes são descritas como anfipáticas, possuem uma porção hidrofóbica (aminoácidos, peptídeos mono/dissacarídeos, polissacarídeos) e hidrofílica (ácidos graxos saturados ou insaturados), o que permite a interação com fluidos de diferentes polaridades (óleo / água e água / óleo). Promovem a redução da tensão superficial e interfacial, aumento na área de contato de compostos insolúveis (tais como hidrocarbonetos) formando microemulsões, promovendo ação de detergência, espumante, solubilizante e lubrificante. Esses compostos podem ser de origem química ou biológica (REZNIK *et al.*, 2010; APARNA *et al.*, 2012). A Figura 1 demonstra como os surfactantes atuam na interface dos líquidos.

Figura 1- Acumulação de biossurfatantes na interface entre líquido e ar



Fonte: PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* (2011).

Os surfactantes sintéticos são produzidos quimicamente a partir de matérias-primas petroquímicas, tais como óxido de etileno, e muitas vezes, o processo de produção apresenta produtos residuais indesejáveis, como: dioxano, dimetilaminopropilamina, nitrosaminas e análogos (PATEU, 2004). Esse fato torna limitante seu uso em ambientes aquáticos, pois menos de 1 mg/L dessas substâncias impedem os organismos aquáticos de se reproduzirem (DEVELTER *et al.*, 2010). A Tabela 1 cita os principais grupos de surfactantes.

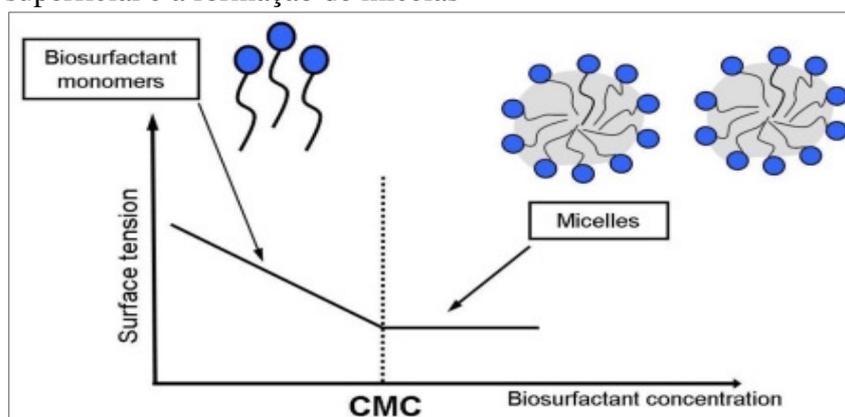
Tabela 1 – Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucaminas	Alquil etoxilatos
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilatos
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de alcoóis graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Fonte: Nitschke e Pastore (2002).

A eficiência de um surfactante é medida pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a força de atração existente entre suas moléculas. Dessa forma a redução da tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m é um parâmetro utilizado para determinar um bom agente surfactante (DESAI; BANAT, 1997). A Concentração Micelar Crítica (CMC) ocorre quando várias micelas são formadas, o que está relacionada com a concentração mínima de surfactante necessária para diminuir ao máximo a tensão superficial. A CMC depende da estrutura do tensoativo, composição, temperatura, força iônica e os tipos de aditivos orgânicos (FUGUET, 2005). A Figura 2 relaciona a concentração dessas moléculas e a formação das micelas.

Figura 2 – A relação entre a concentração de biosurfactantes, tensão superficial e a formação de micelas



Fonte: Whang *et al.* (2008).

2.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são considerados um importante bioproduto, pois apresentam ação tão eficaz como alguns sintéticos amplamente utilizados, tais como SDS (docedil sulfato de sódio), Triton X-100 e Tween 80 (ISHAQ *et al.*, 2015; CHAPRÃO *et al.*, 2015). São biodegradáveis, possuem compatibilidade com o ambiente, pois podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, apresentam baixa toxicidade, o que permite utilizá-los na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos, elevada seletividade devido à presença de grupos funcionais específicos, permitindo especificidade na desintoxicação de poluentes específicos reduzindo as cargas de poluentes, e, por vezes, ser menos sensível a extremos de temperatura, pH e salinidade (PACWA-PLOCIENNICZAKET *et al.*, 2011; HENKEL *et al.*, 2012; AYED *et al.*, 2014; INÈS; DHOUHA, 2015; SHARMA *et al.*, 2016). Algumas moléculas podem atuar como antibióticos, antivirais, inibidor de enzimas e toxinas, inibem a formação de biofilmes por bactérias, embora os mecanismos de ação desses compostos ainda não estejam bem esclarecidos, uma hipótese para a ação dos biossurfactantes é que essas moléculas atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática, causando dano a célula (MAKKAR *et al.*, 2002; ARAUJO *et al.*, 2015).

2.3 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e o microrganismo do qual foi isolado (Tabela 2). As moléculas de baixo peso molecular (glicolipídeos, lipopeptídeos, lípidos-neutros), apresentam maior eficiência para reduzir a tensão superficial e interfacial, e polímeros de alto peso molecular (lipopolissacarídeos e lipoproteínas), são mais eficazes como agentes de estabilização de emulsão (KAPADIA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; MARCHANT; BANAT, 2012).

Tabela 2 – Classificação dos biossurfactantes e os microrganismos produtores

Biossurfactantes	Microrganismos
<i>Glicolípídeo</i>	
Ramnolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trealolípídeo	<i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Arthobacter</i> sp. <i>Arthobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium</i> spp.
Soforolípídeo	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apícola</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Torulopsis cândida</i> <i>T. bombicola</i> <i>T. petrophilium</i>
Mannosylerythritol lipídios (MEL)	<i>Candida antártica</i> <i>Pseudozyma</i>
<i>Lipopeptídeo e Lipoproteína</i>	
Surfactina/Iturina/Fengycin	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettina	<i>Serratiamarcescens</i>
Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Ácidos Graxos, Lipídeos Neutros e Fosfolípídeo</i>	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Corynebacterium insidibasseosum</i> <i>Arthobacter parafineus</i> <i>Talamyces trachyspermus</i>
<i>Surfactantes Poliméricos</i>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
<i>Biossurfactantes particulados</i>	
Vesícula	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	<i>Cyanobacteria</i>

Fonte: Adaptada de Desai e Banat, (1997); Mulligan *et al.* (2001); Nitschke e Costa, (2007).

2.3.1 Glicolípídeo

Os glicolípídeos são constituídos de mono- ou dissacarídeos ligados a uma longa cadeia alifática de ácidos ou ácido hidroxilado. Os ramnolípídeos são a classe mais estudada dentre os glicolípídeos sendo formados por uma ou duas moléculas de L-ramnose que se ligam a um mono ou dímero de ácidos graxo de β -hidroxil. A espécie de *Pseudomonas* é conhecida como produtora de ramnolípídeo. Possuem diversas funções, na biodegradação de hexadecano (BEAL; BETTS, 2000), são antimicrobianos, influenciam na formação de biofilmes (CORADI *et al.*, 2012), diminuem a tensão superficial da água desde 72 mN/m para 25-30 mN/m, são empregados na desintoxicação de poluentes ambientais, dentre outras aplicações inovadoras, como por

exemplo na formulação de produtos farmacêuticos e cosméticos (MAQSOOD *et al.*, 2014).

As moléculas de soforolípídeo são constituídas de uma molécula soforose (2-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose) ligada a um terminal de ácido graxo hidroxilado e são produzidos por diferentes espécies de leveduras (GEYS *et al.*, 2014). A trealose é um trealolípídeo mais conhecido, é um dicassacarídeo não redutor unidos pela ligação α,α -1,1-glicosídica, sendo um dos componentes da parede celular dos gêneros de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium*. A trealose possui bons resultados de aplicação na degradação de hidrocarbonetos, atuando na solubilização e biorremediação de solos contaminados (FRANZETTI *et al.*, 2010; KUYUKINA *et al.*, 2015).

2.3.2 Lipopeptídeo e lipoproteína

Essas moléculas são caracterizadas por um pequeno oligopeptídeo, linear ou circular, unido a um ácido graxo β -hidroxil. O oligopeptídeo varia em número e tipos de aminoácidos. São conhecidos por sua ação antimicrobiana e propriedades tensoativas (FARIA *et al.*, 2011). Os gêneros *Aspergillus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* são reportados como os melhores produtores desse grupo de biosurfactantes.

A surfactina é um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, conhecido por sua atividade anti-inflamatória, anti-tumoral, reduz a formação de biofilmes sintetizados a partir da espécie de *Salmonella* e o crescimento de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter* sp. (LIU *et al.*, 2012; WILLENBACTAER *et al.*, 2014).

2.3.3 Ácidos graxos e fosfolípídeos

Certos microrganismos como *Corynebacterium lepus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida lipolytica* são capazes de produzir grandes quantidades de ácido graxo e surfactantes fosfolípídios durante o crescimento em n-alcenos (DESAI; BANAT, 1997). O estudo a partir de *Sphingobacterium* sp. foi desenvolvido para a produção de um complexo de biosurfactante, composto por três famílias (fosfolípídios, glicolípídios e lipopeptídios), reduzindo a tensão superficial para 33 mN/m (BURGOS-DÍAZ *et al.*, 2011).

2.3.4 Surfactantes Poliméricos

Os surfactantes poliméricos mais estudados são emulsano, liposano, manoproteína, e outros complexos de polissacarídeo-proteína (DESAI; BANAT, 1997; SROKOVA *et al.*, 2011; BOFFA *et al.*, 2014). Emulsano possui uma boa capacidade emulsificante e tem aplicações potenciais na indústria do petróleo, incluindo a formação de emulsões óleo-água para a redução da viscosidade durante o transporte por gasoduto (ASSADI; TABATABAEE, 2010).

Liposan é um emulsionante extracelular solúvel em água produzido por *Candida lipolytica*. É composto por 83% de carboidrato e 17% de proteína, com a porção de carboidrato sendo um heteropolissacarídeo que consiste em glucose, galactose, galactosamina e ácido galactorônico (GAKPE *et al.*, 2007). Biodispersan é um polissacarídeo extracelular, aniônico produzido por *A. calcoaceticus* A2, que atua como um agente de dispersão para sólidos insolúveis em água (ROSENBERG *et al.*, 1988).

2.4 Microrganismos produtores de biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos por uma diversidade de microrganismos, em sua maioria por bactérias, leveduras e em menor quantidade os fungos filamentosos (Tabela 3). Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são considerados os maiores produtores de biossurfactantes (DECESARO *et al.*, 2013).

Tabela 3 – Microrganismos produtores de biossurfactantes

Microrganismos	Tensão superficial* (mN/m)	Referência
<i>Burkholderia plantarii</i>	29,4	Hörmann <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	30,9	Montagnoli <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	28,5	Alvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas</i> SWP-4	24,1	Lan <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	26,87	Faiet <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhodococcus</i> sp.	28	Malavenda <i>et al.</i> , 2015
<i>Azospirillum brasilense</i>	38	
<i>Azospirillum lipoferum</i>	35,5	Morales <i>et al.</i> , 2015

<i>Streptomyces amritsarensis</i> sp.nov.	37	Sharma <i>et al.</i> ,2014
<i>Pichia caribbica</i>	35,9	Joshi-Navare <i>et al.</i> , 2014
<i>Brevibacterium luteolum</i>	27	Vilela <i>et al.</i> , 2014
<i>Streptomyces sp.</i>	32,4	Manivasagan <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas alcalifaciens</i>	39	Jamal <i>et al.</i> , 2014
<i>Chromobacterium violaceum</i>	29	Antunes <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudozyma sp.</i>	33	Sajna <i>et al.</i> , 2013
<i>Marinobacter sp.</i>	32	Yai <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonasputida</i>	31	Janek; Lukaszewicz; Krasowska, 2013

*Os valores são referentes à redução de tensão superficial da água.

2.4.1 *Aureobasidium thailandense*

A taxonomia do gênero *Aureobasidium* foi descrita por diferentes autores onde sua divisão consiste em variedades fenotípicas de *A. pullulans* (ISHIZUKA *et al.*,1989). A levedura *Aureobasidium pullulans* é conhecida por sua capacidade produtora de pululano e enzimas extracelulares incluindo celulase, lipases, esterases, pulano, xilanase (KUDANGA; MWENJE, 2005; TANAKA *et al.*, 2004; DUAN *et al.* 2008). Assim como outros bioprodutos, classificados como óleos extracelulares que possuem capacidade surfactante (PRICE *et al.*, 2013).

Peterson *et al.* (2013) descreveram que a cepa de *Aureobasidium thailandense* sp. nov. é filogeneticamente distinta das outras espécies do gênero *Aureobasidium*. Outros autores reportaram a espécie *A. pullulans* e seus bioprodutos (MANITCHOTPISIT *et al.*,2009; CHI *et al.*,2009), assim como, Deshpande *et al.* (1992) relataram sua capacidade para degradar hidrocarbonetos, tais como querosene, gasolina e parafina. Alguns estudos descrevem as leveduras *Aureobasidium* sp. e seu papel importante na degradação de petróleo em ambiente marinho (XUE *et al.*, 2015). Não foi relatada por outros autores a produção de biossurfactantes por *Aureobasidium thailandense*.

2.5 Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes

Os parâmetros do meio de cultivo irão favorecer ou reprimir a síntese do biossurfactante. O efeito sobre a produção está relacionado à fonte de carbono,

nitrogênio, sais, concentração de NaCl, pH, temperatura, agitação, aeração e ao microrganismo produtor (ROSETO *et al.*, 2003).

A fonte de carbono é considerada um dos fatores que mais influenciam na síntese do biossurfactante, uma vez que pode promover o crescimento do microrganismo. A síntese de surfactante de origem microbiana exige uma combinação de fontes de carbono hidrofílica (glicose, lactose, n-alcanos) e hidrofóbica (óleo de soja, óleo de milho, óleo de linhaça, azeite de oliva e seus efluentes obtidos da produção industrial) (RUFINO *et al.*, 2014; SAJNA *et al.*, 2013). Makkar, Cameotra (2002) observaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* onde a glicose, a sacarose e o piruvato de sódio foram favoráveis na produção do biossurfactante, enquanto o n-hexadecano favoreceu apenas o crescimento da cultura durante a fermentação. Aparma *et al.* (2012) analisaram diferentes substratos de baixo custo, tais como melão, glicerol, soro de leite e meio de fermentação composto sem fonte de carbono, cujo rendimento da produção de raminolipídeos (0,22 g/L) foi inferior se comparada às demais fontes. Utilizando fontes de carbono hidrofóbico, Bhangale *et al.* (2014) relacionaram os diferentes ácidos graxos oriundos do óleo de mamona e glicerol com a estrutura do soforolipídeo produzido por *Starmerella bombicola*.

As fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio são consideradas o segundo fator que mais influência na produção de surfactantes biológicos. O extrato de levedura combinado aos sais de KH_2PO_4 e/ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são as fontes mais utilizadas, pois a variação das suas concentrações influenciam diretamente na relação C/N (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012). Essa razão é avaliada em muitos estudos, pois está diretamente relacionada ao metabolismo microbiano, geralmente a produção de biossurfactantes ocorre em concentrações limitantes de nitrogênio, na fase estacionária de crescimento do microrganismo (DECESARO *et al.*, 2013). Kiran *et al.*, (2009) concluíram que a adição de 10% (NaNO_3) e 25% de extrato de levedura produziu um pequeno aumento na produção de biotensioativo por *Aspergillus ustus*, sendo portanto necessário apenas adição da fonte orgânica de nitrogênio ao meio.

Os parâmetros físico-químicos temperatura, agitação, aeração e pH são fatores que influenciam no rendimento da produção, assim como os fatores bioquímicos. A temperatura pode favorecer o decréscimo ou aumento da síntese de biossurfactante, pois o aumento da biomassa favorece a liberação dos produtos metabólicos da célula microbiana (SAHOO *et al.*, 2011). O pH do meio influencia o crescimento celular e a síntese de metabólitos secundários. O rendimento da produção

de lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* foi estável sobre condições alcalinas e neutras (ZHAO *et al.*, 2013). Khopade *et al.* (2012) otimizaram a produção do biossurfactante por *Nocardiopsis* sp. em pH 7,0 a temperatura de 30°C, reduzindo a tensão superficial para 30 mN/m. A produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu o aumento do rendimento entre a faixa de pH 7,0 - 7,15 (AL-ARAJI *et al.*, 2007) e a temperatura ótima foi de 37 °C (GEORGE; JAYACHANDRAN, 2013).

A agitação e a aeração possuem efeitos combinados, pois ambos facilitam a transferência de oxigênio no meio de fermentação (AQUARONE, 2001). Estes fatores também auxiliam a produção de biossurfactantes, pois possibilitam a solubilização de substratos insolúveis em água e conseqüentemente o transporte de nutrientes no meio de fermentação para o microrganismo (RAMKRISHNA *et al.*, 2010). Willenbacher *et al.* (2015) observaram um acréscimo do rendimento durante a produção de surfactina aplicando o processo fermentativo anaeróbico para controlar a formação de espuma.

2.5.1 Resíduos de baixo custo como matéria-prima para a produção de biossurfactantes

Os substratos obtidos a partir de resíduos industriais são considerados promissores para a elaboração e estudo do meio de fermentação. Os resíduos agroindustriais são fontes de carboidratos, lipídeos e nitrogênio e podem ser úteis ao crescimento microbiano. Esses substratos de baixo custo abrangem principalmente efluentes da produção de azeite, extrato de óleos vegetais e seus resíduos, resíduos de destilaria e soro de leite e efluentes do processamento de batata e mandioca (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

A substituição por fontes renováveis como óleos pós-fritura, glicerol, melão, milhocina e materiais lignocelulósicos (SOUSA *et al.*, 2014; ANDRADE, 2013; CERQUEIRA *et al.*, 2010; IMURA *et al.*, 2013), reduz os custos do processo, visto que a matéria-prima corresponde a 30% do valor total da produção de biossurfactantes. A Tabela 4 mostra a produção de surfactante biológico a partir de resíduos.

Tabela 4 – Substratos de baixo custo utilizados para a produção de biossurfactantes

Organismo	Resíduo	Biossurfactante	Referência
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CSL	Biossurfactante	Vecino <i>et al.</i> , 2015
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Material lignocelulósico	Biotensoativo	Portilla <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida Antarctica</i>	Óleo vegetal	Biossurfactante	Accorsiniet <i>al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	Suco de caju	Surfactina	Rocha <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida lipolytica</i>	Gordura animal	Glicolípideo	Santos <i>et al.</i> , 2013
<i>Nevskia ramosa</i>	Efluente de óleo de palma	biossurfactante	Chooklinet <i>al.</i> , 2013
<i>Leucobacter komagatae</i>	Melaço e glicerol	biossurfactante	Saimmaiet <i>al.</i> , 2012

A produção de biossurfactantes a partir de fontes renováveis é uma alternativa que visa reduzir os custos, pois os surfactantes sintéticos embora possam ser tóxicos, são competitivos, pois o baixo rendimento dos surfactantes biológicos restringe sua aplicação (RODRIGUES *et al.*, 2006). Outros fatores como potencial de aplicação, métodos de purificação e fornecimento contínuo da matéria-prima devem ser considerados para produção em escala industrial (BANAT *et al.*, 2014). A Tabela 5 estabelece a relação de vantagem e desvantagens para o uso de matérias-primas de baixo custo.

Tabela 5 – Vantagens e desvantagens do uso de substratos de baixo custo na produção de biossurfactantes

Vantagens	Desvantagens
O custo de produção pode ser reduzido	Substratos contem compostos indesejáveis
Substratos renováveis são mais disponíveis	É necessário processamento ou tratamento dos substratos para usá-los como fonte de carbono ou nitrogênio
Aumento da produção de biossurfactante/ bioemulsionante	O produto final pode apresentar a cor e/ou impurezas dos substratos (por exemplo, melaço)
Propriedades funcionais básicas do produto não mudam	Técnicas especiais de purificação podem aumentar o custo de produção
Substrato bruto pode não ser específico para diferentes organismos	Dificuldade do fornecimento contínuo de matéria-prima de composição similar
Todos os componentes são atóxicos	Uma grande quantidade de substrato para fornecimento contínuo para a produção

Fonte: Banat *et al.* (2015).

2.6 Aplicação dos biossurfactantes

2.6.1 Indústria Petroquímica

A necessidade de utilizar surfactantes biológicos frente aos sintéticos é atribuída as suas características de baixa toxicidade e fácil biodegradabilidade na natureza (AYED *et al.*, 2013). A aplicação de biossurfactantes facilita a extração, transporte e armazenamento do petróleo (BUSTAMANTE; DURÁN; DIEZ, 2012). Dessa forma, os biossurfactantes possuem uma vasta aplicação na indústria de petróleo atuando na recuperação melhorada de petróleo (MEOR), perfuração de poços, dispersão de hidrocarbonetos, redução da viscosidade e formação de emulsão (SILVA *et al.*, 2014).

A produção de biossurfactantes para uso em biorremediação foi reportada por Noparat *et al.* (2014) a partir de *Sphingobacterium spiritivorum* produzindo emulsão estável superior a 40 % para 11 hidrocarbonetos. *Paenibacillus* sp. isolado a partir do petróleo em estudo realizado por Gudiña *et al.* (2015) para a produção de bioemulsificante. Gêneros de *Bacillus* foram reportados como cepas capazes de degradar cadeias longas de alcanos e reduzir a viscosidade de misturas de hidrocarbonetos sob condições anaeróbias (GUDIÑA *et al.*, 2012). Youssef *et al.*, (2013) realizaram testes injetando uma mistura de nutriente e cepas de *Bacillus* em poços para avaliar a recuperação de petróleo, os resultados mostraram que a produção do biossurfactante aumentou duas vezes a concentração mínima necessária para mobilizar óleo retido em núcleos de arenito.

A aplicação de surfactantes biológicos para este fim é um recurso promissor levando em consideração o estudo de moléculas produzidas a partir de outras cepas produtoras de biossurfactante extremofílicos e hiper-extremofílicos (PERFUMO *et al.*, 2010).

2.6.2 Indústria de Alimentos

São utilizados como emulsificantes, na estabilização de emulsões, formação de espuma, consistência e textura dos alimentos (AMARAL *et al.*, 2006). O emulsionante produzido a partir de *Enterobacter cloacae* foi caracterizado como agente de melhoramento da viscosidade de interesse na indústria alimentar, especialmente

devido à boa viscosidade observada a pH ácido, permitindo a sua utilização em produtos contendo ácido cítrico ou ascórbico (IYED; MODY; JHA, 2006). No processamento de alimentos, a adição de ramnolípídeo melhorou a textura e a vida de prateleira evitando a contaminação do produto (HAESSENDONCK; VANZEVEREN, 2004).

2.6.3 Outras aplicações

A surfactina é conhecida por sua aplicação farmacêutica, possui atividade hemolítica, anti-tumoral e anti-microbiana (CAO *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012). Segundo Gudiña *et al.* (2013) certos biossurfactantes como os glicolípídeos apresentam potencial terapêutico, pois apresentam a capacidade para interagir com as membranas das células de vários organismos, sendo úteis para a administração de fármacos. O uso dessas moléculas reduz a toxicidade gerada pelo uso de surfactantes sintéticos na formulação de microemulsões associados ao aumento da biodisponibilidade oral do agente terapêutico e eficiência na emulsificação (RODRIGUES, 2015).

Biossurfactante soforolípídeo produzido por *Candida* sp. foi reportado como potencial substituto de detergentes devido sua propriedade emulsionante (PRICE *et al.*, 2012). Sajna *et al.* (2013) a partir de *Pseudozyma* sp. obtiveram um biossurfactante capaz de remover manchas podendo ser utilizado na formulação de detergentes. Estudo similar foi realizado por Khaje e Fazaelpoo (2012) onde o biotensoativo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* foi eficaz na remoção de manchas de óleo comestível e chocolate, possuindo uma boa biodegradabilidade.

Outros biossurfactantes possuem aplicação na agricultura em formulações de herbicidas e pesticidas, biodegradação de poluentes, crescimento de plantas (SACHDEV *et al.*, 2013). Alguns estudos relacionam a capacidade de microrganismos na produção de biossurfactantes na inibição do crescimento de outras culturas para sua aplicação no controle de patógenos de plantas (VATSA *et al.*, 2010). Ramnolípídeo produzido a partir de *Pseudomonas* sp. apresentou atividade inseticida frente pragas agrícolas do tipo pulgões (*Myzus persicae*) afetando a organização celular do organismo após o tratamento com o biossurfactante (KIM *et al.*, 2011). Jang *et al.*, (2013) relataram a produção de orfamide A, um biossurfatante com propriedades inseticida.

A aplicação na formulação de produtos cosméticos foi reportada por Morita *et al.*, (2013) como bom ingrediente na formulação de hidratantes para pele seca, para

tratamentos de reparação capilar, dentre outros benefícios a partir de biossurfactante MELs. Para uso farmacêutico e cosmético por *Paenibacillus macerans* (LIANG *et al.*, 2014), os soforolípídeo são utilizados comercialmente como umectantes, os ramnolípídeos são apontados como biocompatíveis e ideais para uso cosmético (IRFAN-MAQSOOD; SEDDIQ-SHAMS, 2014), assim como os lipopeptídeos (VARVARESOU; IAKOVOU, 2015).

2.8 Métodos de recuperação do biossurfactante

Os métodos de recuperação de biossurfactantes correspondem a 60% do custo total da produção. A recuperação dos biotensoativos depende de sua carga iônica, solubilidade em água e do local de produção (intracelular, extracelular). Os solventes mais utilizados para extração do biossurfactantes são: clorofórmio, metanol, butanol, acetato, pentano, hexano, dentre outros (KARDENA *et al.*, 2011). Para o processo de caracterização da molécula é necessário aplicar outras técnicas como TLC, HPLC, FTIR, GC-MS de forma combinadas ou individual (RIBEIRO *et al.*, 2012; CHAKRABORTY *et al.*, 2015; BHARDWAJ *et al.*, 2015). A Tabela 6 demonstra os principais métodos utilizados na recuperação e as características do processo.

Tabela 6 – Métodos de recuperação de biossurfactantes

Método de recuperação	Biossurfactante	Características do processo
Extração com solventes orgânicos	Soforolípídeos, liposan e trealolípídeos	Purificação parcial
Centrifugação	Glicolípídeos	Recuperação do surfactante bruto
Adsorção	Lipopeptídeos, glicolípídeos e ramnolípídeos	Alto grau de pureza
Cristalização	glicolípídeos	Processo em batelada
Precipitação ácida	Surfactina	Eficiente na recuperação do surfactante bruto
Precipitação com acetona	Glicolípídeos e biemulsificantes	Método simples e de baixo custo
Ultrafiltração	Glicolípídeos, surfactina	Alto grau de pureza
Fracionamento de espuma	Surfactina	Pureza elevada do produto

Fonte: Mukherjee *et al.* (2006); Sourav *et al.* (2015).

Os altos custos das etapas de *downstream* dificultam a competição dos biossurfactantes frente aos surfactantes. Dessa forma a aplicação dos biossurfactantes

em setores petroquímicos, ambientais, indústrias de tintas e têxteis, permitem a obtenção de um produto bruto, ou seja, sem necessidade de etapas adicionais de purificação. Em contrapartida, os biossurfactantes com grau de pureza mais elevado são necessários para fins farmacêuticos, cosméticos e alimentares (BARCELOS *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade da cepa *Aureobasidium thailandense* em produzir um tensoativo e/ou emulsificante a partir de fermentação submersa, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio.

3.2 Objetivos específicos

- Utilizar a cepa *Aureobasidium thailandense* para a produção de biossurfactante a partir de fermentação submersa;
- Avaliar a composição do meio fermentativo a partir dos resíduos agroindustriais (água residual da produção de azeite, melão e água de maceração de milho);
- Realizar o estudo da composição do meio de cultura através de planejamento experimental para melhorar a produção do biossurfactante;
- Realizar a extração do biossurfactante e caracterizar a molécula.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção da cepa produtora de biossurfactante

As culturas foram isoladas pelo Laboratório de Biotecnologia - LABIOTEC, da Universidade Federal do Ceará (UFC), depositadas na Micoteca UM da Universidade Federal de Pernambuco. A triagem para avaliar a capacidade para produção de biossurfactante foi realizada a partir de 5 cepas de *Aureobasidium pullulans* (URM 7059, URM 7051, URM 7053, URM 7058), *Aureobasidium pullulans* (isolada do pedúnculo do caju) e *Aureobasidium thailandense* (isolada da palha de cana de açúcar).

A fermentação submersa foi realizada em *skaker* orbital por 144 horas, a 200 rpm e 28 °C, pH 5,5 em Erlenmeyer contendo 350 mL de meio de cultura, como mostra a Tabela 7. As amostras foram submetidas à centrifugação (4000 rpm, 15 min) para obtenção do sobrenadante para realização das análises.

Tabela 7 – Composição do meio de cultura para triagem da levedura produtora de biossurfactante

Nutriente	Composição
Carbono (6 g/L)	Glicose
Nitrogênio (3g/L)	Extrato de levedura
Indutor 2 % (v/v)	Azeite de oliva
Sais (1 g/L)	KH ₂ PO ₄

Fonte: Campos *et al.*, 2014 (adaptado).

4.2 Microrganismo

A cultura de *Aureobasidium thailandense*, selecionada para o processo fermentativo, foi isolada do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) por Holanda (2015) do Laboratório de Biotecnologia - LABIOTEC, da Universidade Federal do Ceará (UFC). A partir do estoque liofilizado, o microrganismo foi semeado em meio padrão - Caldo Batata Dextrose (CBD) ou Caldo Sabouraud (CS) – (HIMEDIA) para o crescimento e ativação e incubado a 28°C por 24h, sob agitação de 200 rpm. Após esse período, foi transferido para placas de Ágar Batata Dextrose ou Ágar Sabouraud e novamente foi incubado a 28°C por 72 h. A incubação foi realizada em *shaker* orbital a 200 rpm e 28°C por 24h.

4.3 Preparo do inóculo

Para obter o inóculo na fase exponencial de crescimento foi avaliado o crescimento da levedura durante a ativação da cultura (24 horas) e aumento da biomassa (48 horas), utilizando caldo YPD (yeast peptone dextrose) em *shaker* orbital a 200 rpm e 28°C. A concentração de células para o início da fermentação foi de 1×10^7 cel/mL, na proporção de 5 % (v/v).

4.4 Produção do biosurfactante

4.4.1 Estudo das fontes de carbono e nitrogênio

A cepa de *Aureobasidium thailandense* foi submetida aos testes com diferentes fontes de carbono (melaço, glicose, azeite de oliva e água residual da produção de azeite – OMW) e nitrogênio (extrato de levedura e água de maceração do milho – CSL). O melaço de cana foi gentilmente fornecido pelas Refinarias de Açúcar Reunidas, SA (Portugal) e CSL cedido pelo COPAM: Companhia Portuguesa de Amidos, SA (Portugal). Em sua composição o melaço contém 490 g/L de carboidratos e 0,6 g/L de proteína, enquanto que o CSL possui 75 g /L de carboidratos e 5 g/L de proteína. Carboidratos e concentrações de proteína total foram determinados usando os métodos fenol-sulfúrico e Lowry, respectivamente (Dubois *et al.*, 1956; Lowry *et al.*, 1951).

A composição da água residual da produção de azeite foi realizada por GC/MS, como descrito do item 4.5.7. A Tabela 8 mostra a composição em ácidos graxos e suas concentrações.

Tabela 8 – Perfil dos ácidos graxos da água residual da produção de azeite (OMW)

Composição	Concentração (v/v %)
C16:0 Ácido Palmítico	11,9
C16:1 Ácido Palmitoleico	-
C18:0 Ácido Estearico	3,0
C18:1 Ácido Oleico	78,5
C18:2 Ácido Linoleico	6,6
C18:3 Ácido Linolenico	-
C20:0 Ácido Eicosanoico	-

A fermentação submersa foi realizada em *skaker* orbital por 144 horas, a 200 rpm e 28 °C, pH 5,5 em Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, como mostra a Tabela 9. As amostras foram coletadas no intervalo de 24 horas e submetidas à centrifugação (4000 rpm, 15 min) para obtenção do sobrenadante para realização das análises. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 9 – Composição dos meios de fermentação para produção de biossurfactantes

Nutriente	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
Carbono (6 g/L)	Melaço	Glicose	Glicose	Melaço
Nitrogênio (3g/L)	Extrato de levedura	CSL	Extrato de levedura	CSL
Indutor 2 % (v/v)	Azeite de oliva	Azeite de oliva	OMW	OMW
Sais (1 g/L)	KH ₂ PO ₄			

CSL - Água de maceração de milho; OMW - água residual da produção de azeite.

4.4.2 Otimização do meio de cultura

Influência das fontes de nitrogênio e concentração de OMW na produção do biossurfactante

O estudo preliminar foi realizado com objetivo de analisar o efeito das fontes de nitrogênio (extrato de levedura e água de maceração do milho) e das concentrações da água residual da produção de azeite no meio de produção do biossurfactante. Foram selecionadas três variáveis a partir dos testes com diferentes meios de fermentação (Tabela 10). O fatorial fracionado 2^{3-1} , incluindo 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. Os valores foram gerados no *Software* Statistica v 7.0 (Statsoft).

Tabela 10 – Fatorial fracionado (2^{3-1}) para selecionar as variáveis mais significativas segundo seus efeitos

Ensaio	Extrato de leveduras (g/L)	OMW (v/v) %	CSL (g/L)
1	1,0	1,0	2,0
2	2,0	1,0	1,0
3	1,0	3,0	1,0
4	2,0	3,0	2,0
5 (C)	1,5	2,0	1,5
6 (C)	1,5	2,0	1,5
7 (C)	1,5	2,0	1,5

Estudo das concentrações de extrato de levedura e OMW na produção do biossurfactante

Um planejamento fatorial completo (CCRD) foi realizado para otimizar as concentrações de extrato de levedura e da água residual da produção de azeite, que foram as variáveis significativas de acordo com o planejamento fatorial fracionado. O experimento foi conduzido com duas variáveis em dois níveis (2^2) incluindo 4 ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 11). O planejamento foi gerado no *Software* Statistica v 7.0 (Statsoft).

Tabela 11 – Planejamento completo para otimização do meio de cultura (DCCR- 2^2)

Ensaio	OMW (v/v) %	Extrato de levedura (g/L)
1	1,00	1,50
2	1,00	4,50
3	1,00	1,50
4	3,00	4,50
5	0,58	3,00
6	3,41	3,00
7	2,00	0,87
8	2,00	5,12
9 (C)	2,00	3,00
10 (C)	2,00	3,00
11 (C)	2,00	3,00

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação de açúcar redutor

O método utilizado para quantificar a concentração de açúcares redutores em g/L é baseado no método de Miller utilizando o reagente de DNS. O teste baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, a leitura é realizada em espectrofotômetro com absorvância de 540nm (MILLER, 1959). A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de glicose com concentrações de 0,2 g/L a 3 g/L, foram adicionados 0,5 mL de cada solução padrão e 0,5 mL da solução de DNS. Posteriormente a mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e resfriada em banho de gelo e a absorvância medida em um espectrofotômetro (UV/VISJasco V- 560).

4.5.2 Avaliação da biomassa

Os sobrenadantes de cada cultura foram submetidos ao processo de centrifugação (4000 rpm, 15 min) para a lavagem das células. A secagem foi realizada em estufa de circulação de ar, a 80°C por 24 horas para obter o peso seco constante (SANTOS, 1996).

4.5.3 pH

O pH do meio de fermentação foi determinado através da leitura em potenciômetro (Adamo), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

4.5.4 Contagem de células viáveis

A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer e observada ao microscópio óptico na objetiva de 40x (Zeiss). A suspensão de levedura corada com azul de metileno para determinar as células viáveis expressa em células/ mL (ANTONINI, 2004).

4.5.5 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi medida no tensiômetro modelo alemão Kruss (K-6), que utiliza o método do anel (RODRIGUES *et al.*, 2006). As análises foram realizadas com o sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra bruta, a uma temperatura de

25°C. Foram realizadas duas medidas para cada ponto em estudo, sendo considerada a média aritmética dos resultados de cada fermentação realizada em triplicata. O tensiômetro foi calibrado com água destilada.

4.5.6 Determinação do índice de emulsificação

O índice foi determinado de acordo com o método de Wei *et al.* (2005). Foram adicionados a tubos de ensaio 2,0 mL do sobrenadante e 2,0 mL de hexadecano. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e permaneceu em repouso por 24 horas. O índice de emulsificação foi determinado pela Equação (1).

$$E_{24} = \frac{H_{emulsão}}{H_t} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

E_{24} = índice de emulsificação após 24h (%)

$H_{emulsão}$ = Altura da emulsão (cm)

H_t = Altura total

4.5.7 Caracterização das águas residuais da produção de azeite

A análise da água residual da produção de azeite (*olive mill wastewater*) foi realizada em parceria com o Núcleo de Análise e Desenvolvimento de Processos (NADP) do Departamento de Engenharia de Química da Universidade Federal do Ceará – UFC, supervisionado pelo Professor Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.

O resíduo liofilizado foi adicionado a uma mistura contendo 5 mL de metanol e 15 μ L de H_2SO_4 sendo submetida a temperatura de 60 °C durante 1 hora, para obter a amostra esterificada. A análise foi realizada em quadrupolo simples THERMOS ISQ GC/MS. A temperatura foi programada para o intervalo 303 K a 573 K, com uma coluna capilar OV-1 (30 m x 0,25 mm ID x filme de 0,25 mm) utilizando gás hélio a 1,0 mL/min para separação e identificação dos ésteres metílicos.

4.5.8 Método de extração do biossurfactante

O biossurfactante foi extraído a partir do sobrenadante da fermentação livre de células pelo método Folch, na proporção (1:1) clorofórmio/sobrenadante. A mistura foi homogeneizada por 30 minutos e a fase orgânica foi separada em funil de separação após 24 horas. O clorofórmio foi evaporado em rotaevaporador a 40°C por 40 minutos (FOLCH; LESS; STANLEY, 1956). Após evaporação do solvente o biossurfactante bruto foi congelado e liofilizado para posterior caracterização molecular.

4.5.9 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) foi representada graficamente a partir da tensão superficial em função do logaritmo da concentração do biossurfactante. As concentrações variaram de 5 a 0,001 mg/mL e foram preparadas a partir do biossurfactante liofilizado em água destilada. A partir dessa relação foi encontrado no ponto de intersecção entre as duas retas o valor que melhor se adapta aos dados de pré e pós-CMC. A tensão de superficial de cada amostra foi medida pelo método do anel à temperatura ambiente (25 °C). As medições foram realizadas em duplicata (GUDIÑA *et al.*, 2010).

4.5.10 Caracterização do biossurfactante bruto

As análises foram realizadas em parceria com o Núcleo de Análise e Desenvolvimento de Processos (NADP) do Departamento de Engenharia de Química da Universidade Federal do Ceará – UFC, supervisionado pelo Professor Dr. Fabiano Fernandes.

4.5.10.1 Análise de Fourier espectrometria de infravermelho (FT-IR)

A identificação dos grupos funcionais do biossurfactante foi realizada por FTIR. O modelo utilizado de FTIR foi Cary 630, em comprimentos de onda de 700 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 1 cm^{-1} . Todas as análises foram realizadas em triplicata. Amostra foi aplicada diretamente no equipamento.

4.5.10.2 Espectrometria de massa

A análise foi realizada em quadrupolo simples THERMOS ISQ GC/MS. A temperatura foi programada para o intervalo 303 K a 573 K, com uma coluna capilar OV-1 (30 m x 0,25 mm ID x filme de 0,25 mm) utilizando gás hélio a 1,0 mL/min para separação e a identificação dos ésteres metílicos.

4.5.10.3 Ressonância magnética nuclear

A análises de RMN foram realizadas em um equipamento Agilent 600-MHz a 298 K utilizando clorofórmio deuterado como solvente. O espectro de RMN foi processado através da multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0.3 Hz com transformada de Fourier de 64K pontos. A integração do sinal foi manual.

4.5.11 Análise de dispersão em petróleo bruto

A capacidade de dispersão da camada de petróleo bruto foi realizada adicionando 10 mL de água destilada em placa de Petri de 5 cm, utilizando 700 µL de petróleo e 40 µL do agente surfactante SDS ou biosurfactante liofilizado (diluído em água destilada) na concentração de 10 mg/mL. O controle foi realizado substituindo a amostra por água destilada. A capacidade de dispersão foi determinada a partir do diâmetro da zona clara. Os ensaios foram realizados em triplicata a partir da mesma amostra (RODRIGUES *et al.*, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da cepa produtora de biossurfactante

Screening prévio foi realizado a partir dos valores de redução da tensão superficial do caldo fermentado e formação de emulsão com hexadecano, como mostra a Tabela 12. De acordo com os resultados a levedura *Aureobasidium thailandense* favoreceu uma maior redução da tensão superficial (15,3 mN/m) do caldo fermentado se comparada as demais leveduras, obtendo um índice de emulsificação (E_{24}) de 63%. Dessa forma a cepa de *Aureobasidium thailandense* foi selecionada para realizar os estudos posteriores para a produção de biossurfactante a partir das fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo.

Tabela 12 – *Screening* para seleção de levedura produtora de biossurfactante realizada em skaker orbital por 144 horas

Microrganismo	TS _I (mN/m)	TS _F (mN/m)	Δ TS (mN/m)	Índice de emulsão (E_{24} %)
<i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059	48,3	40,1	8,20	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7051	48,3	35,3	13,0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053	48,3	36,0	12,3	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7058	48,3	37,5	10,8	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	48,3	46,5	1,80	0
<i>Aureobasidium thailandense</i>	48,3	33,0	15,3	63,0

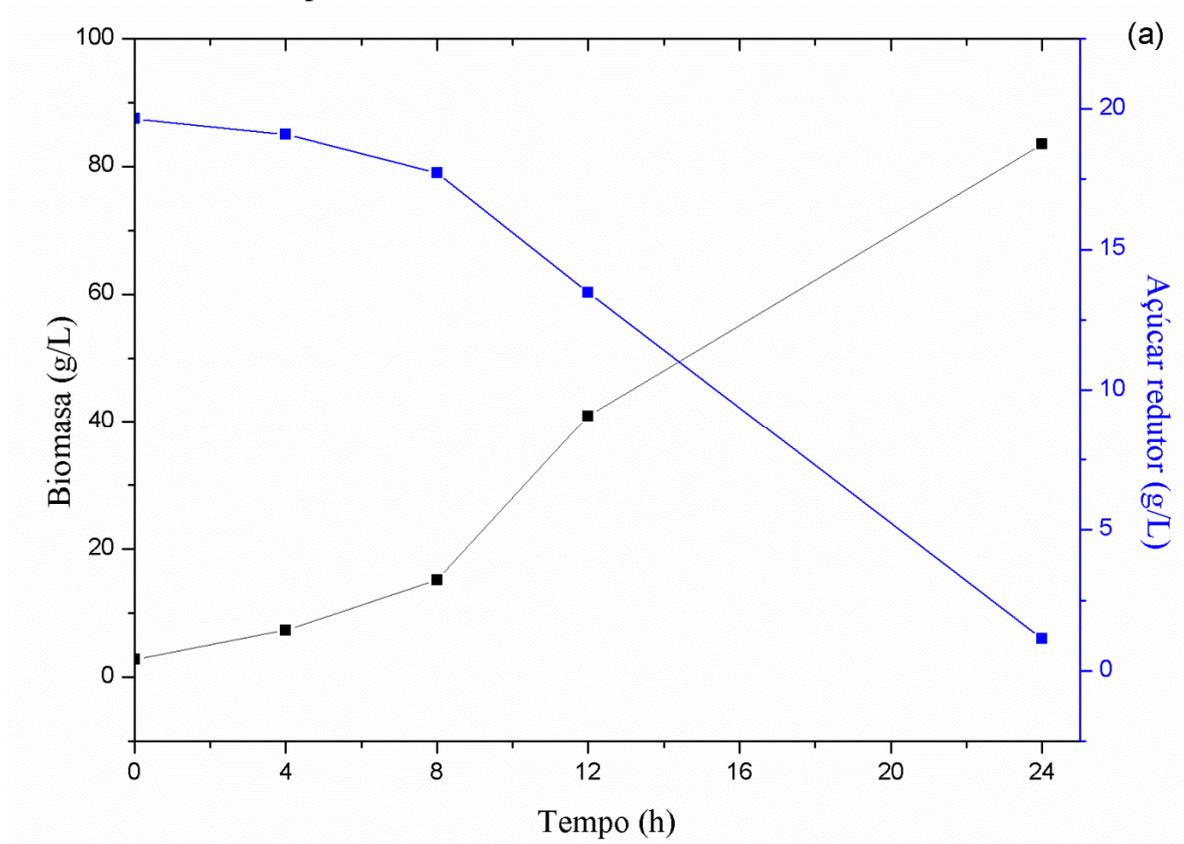
TS_I: Tensão superficial inicial; TS_F: Tensão superficial final; Δ TS: Redução da tensão superficial.

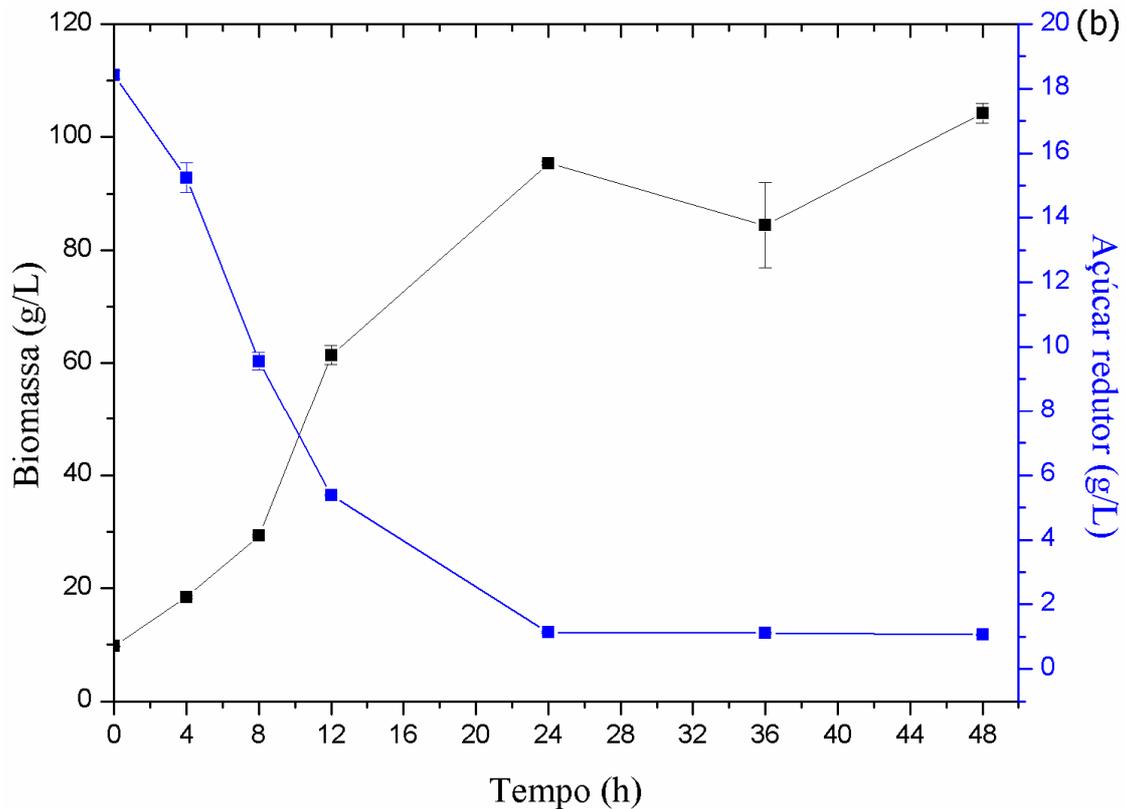
5.2 Preparo do inóculo

O preparo da cultura de *A. thailandense* foi acompanhado a partir das curvas de biomassa e açúcar redutor (Figura 3), com o intuito de conhecer o tempo ideal para o crescimento da cultura, aproveitando melhor seu metabolismo na produção do biossurfactante. O início da fase exponencial de crescimento é atingido em 12 horas de incubação (Figura 3a). A mesma fase de crescimento foi observada para o inóculo (Figura 3b), com a biomassa atingindo 60 g/L e consumo do açúcar redutor em quase 50

% do total. Segundo Madigan *et al.* (2010) durante essa fase o microrganismo encontra-se apto a divisão celular, sendo considerado o período em que a célula apresenta condições para um metabolismo saudável. Portanto o tempo de 12 horas foi considerado ideal para a inoculação no meio de fermentação. A concentração de células para o início da fermentação foi de 1×10^7 cel/mL, na proporção de 5 % (v/v).

Figura 3 – Influência do tempo na produção de biomassa e consumo de açúcares redutores em (a) pré-inóculo e inóculo (b) de *Aureobasidium thailandense* em caldo YPD em *shaker* a 200 rpm e 28 °C





5.3 Composição do meio de fermentação a partir de resíduos de baixo custo

Os resultados para produção de biossurfactante por *A. thailandense*, descrevem os valores de redução de tensão superficial e capacidade emulsificante de n-hexadecano. Esses dados foram mensurados a partir do meio de cultivo livre de células (Tabelas 13 a 16). A composição dos meios de cultura encontra-se no item 4.4.1.

Segundo a Tabela 13 a composição do meio de cultura contendo melaço (fonte de carbono) favoreceu a produção do biossurfactante por *A. thailandense*, reduzindo a tensão superficial do caldo fermentado de 50 mN/m para $33 \pm 1,4$ mN/m em 48 horas de fermentação. O biossurfactante produzido não apresentou capacidade para emulsionar hexadecano. A redução de tensão superficial foi de $17,0 \pm 1,4$ mN/m ao final das 48 horas de fermentação, valores próximos foram relatados por Solaiman *et al.* (2007) a partir de *Candida bombicola*, *Bacillus subtilis* B20 com ΔST 14 mN/m e ΔST 20 mN/m por *Pseudozyma aphidis* (DZIEGIELEWSKA; ADAMCZAK, 2013).

Tabela 13 – Produção de biossurfactante por *A. thailandense* em meio fermentativo composto por melaço (6 g/L) e azeite de oliva (2% v/v) como fonte de carbono

Tempo (h)	Açúcar redutor (g/L)	Células viáveis (cel/mL)	Tensão superficial (mN/m)		E ₂₄ (%)
			TS	ΔTS	
0	6,36 ± 0	1,28 x 10 ⁶	50,0 ± 0	0	0
24	9,92 ± 0,2	1,10 x 10 ⁸	35,0 ± 0	15 ± 0	0
48	16,0 ± 0	8,16 x 10 ⁷	33,0 ± 1,4	17 ± 1,4	0
72	13,0 ± 0,5	2,16 x 10 ⁷	33,0 ± 1,4	17 ± 1,4	0
96	13,76 ± 0,8	1,54 x 10 ⁴	32,5 ± 0,7	17 ± 0,7	0
120	5,60 ± 0	0	32,5 ± 0,7	17 ± 0,7	0
144	4,55 ± 0	0	32,5 ± 0,7	17 ± 0,7	0

TS: Tensão superficial; ΔTS: Redução da tensão superficial; E₂₄: Índice de emulsão.

A substituição do extrato de levedura pela água de maceração do milho (CSL – *corn steep liquor*) como fonte de nitrogênio (Tabela 14) resultou na redução da tensão superficial de 12 ± 2,1 mN/m do caldo fermentado após 48 horas de fermentação. Após esse período os valores de tensão aumentaram provavelmente pelo consumo da molécula tensoativa pela levedura e/ou degradação do biossurfactante. O CSL como fonte de nitrogênio não favoreceu a produção de uma molécula com boa capacidade tensoativa, mas favoreceu a produção de uma molécula com propriedade emulsificante após 96 horas de fermentação. A partir de 96 horas pode-se verificar um índice de emulsificação (E₂₄) = 44 ± 3,3 %.

Tabela 14 – Produção de biossurfactante por *A. thailandense* em meio fermentativo composto por glicose (6 g/L) e azeite de oliva (2% v/v) como fonte de carbono, água de maceração do milho (3 g/L) como fonte de nitrogênio

Tempo (h)	Açúcar redutor (g/L)	Células viáveis (cel/mL)	Tensão superficial (mN/m)		E ₂₄ (%)
			TS	ΔTS	
0	5,8 ± 0,4	8 x 10 ⁵	49,5 ± 0,7	0	0
24	1,40 ± 0	6 x 10 ⁷	39,0 ± 0	10,5 ± 0,7	0
48	1,50 ± 0,2	7,2 x 10 ⁶	37,0 ± 2,5	12,5 ± 2,1	0
72	1,45 ± 0,5	8 x 10 ⁵	41,0 ± 2,5	8,5 ± 2,5	0
96	1,40 ± 0	8 x 10 ⁴	43,0 ± 0	6,5 ± 0,7	44,0 ± 3,3
120	1,40 ± 0	8 x 10 ⁴	42,0 ± 0	7,5 ± 0,7	47,0 ± 1,1
144	1,40 ± 0	8 x 10 ³	42,0 ± 0	7,5 ± 0,7	51,0 ± 2,3

TS: Tensão superficial; ΔTS: Redução da tensão superficial; E₂₄: Índice de emulsão.

A substituição de azeite de oliva pelo resíduo da produção de azeite (*olive mill wastewater*), segundo os resultados apresentados na Tabela 15, favoreceu a produção do biossurfactante, reduzindo a tensão superficial em 18 ± 2,0 mN/m no

decorrer de 48 horas de fermentação. O biotensoativo produzido apresentou boa capacidade para formar emulsão com valores de E_{24} de até 53 %. A partir dessa combinação de nutrientes a levedura *A. thailandense* pode ter sua ação comparada ao gênero *Pseudomonas* considerado um dos melhores produtores de biossurfactantes (APARMA; SRINIKETHANA; SMITHA, 2012). Saikia *et al.* (2014) analisaram a capacidade surfactante em fermentação submersa por *Pseudomonas aeruginosa* RS29 onde a redução da tensão do meio foi de 8 mN/m e E_{24} de 67 %, utilizando o azeite de oliva como única fonte de carbono. Outro fator importante é que o aproveitamento da água residual da produção de azeite reduz os custos da produção e minimiza o impacto ao meio ambiente. Segundo Ramírez *et al.* (2015) a OMW não gera problemas nas etapas de *downstream*, facilitando os processos de separação.

Tabela 15 – Produção de biossurfactante por *A. thailandense* em meio fermentativo composto por glicose (6 g/L) e água residual da produção de azeite (2% v/v) como fonte de carbono

Tempo (h)	Açúcar redutor (g/L)	Células viáveis (cel/mL)	Tensão superficial (mN/m)		E_{24} (%)
			TS	Δ TS	
0	7,20 ± 0,5	1,12 x 10 ⁶	50,5 ± 0,7	0	0
24	1,00 ± 0,2	8,0 x 10 ⁷	35,5 ± 0,7	15 ± 0,7	16 ± 0
48	0,42 ± 0,6	3,6 x 10 ⁷	32,0 ± 1,4	18 ± 2,0	50 ± 0
72	0,40 ± 0,35	2,4 x 10 ⁷	32,5 ± 2,1	16 ± 2,5	53 ± 4,7
96	0,33 ± 0	2,3 x 10 ⁷	32,5 ± 0,7	18 ± 0,7	53 ± 4,7
120	0,33 ± 0	2,4 x 10 ⁷	32,0 ± 0	18,5 ± 0,7	53 ± 0
144	0,30 ± 0	1,44 x 10 ⁷	32,0 ± 0	18,5 ± 0,7	53 ± 0

TS: Tensão superficial; Δ TS: Redução da tensão superficial; E_{24} : Índice de emulsão.

O tensoativo produzido por *A. thailandense* no meio de cultura composto por todos os resíduos (melaço, CSL e OMW) favoreceu a redução da tensão superficial em 15 ± 1,4 mN/m a partir de 48 horas de fermentação (Tabela 16). Segundo Rufino *et al.* (2014) uma redução de 50% da tensão foi observada para o caldo fermentado por *Candida lipolytica* a partir de meio composto por resíduos de soja. A combinação de resíduos como única fonte de nutrientes também foi reportada por Fontes *et al.* (2012) obtendo variação da tensão superficial de 18 mN/m utilizando glicerina e suco de frutas clarificado para fermentação por *Yarrowia lipolytica*. Jara *et al.* (2013) utilizaram meio composto por óleo de palma e água de maceração do milho para a síntese de biossurfactante por *Geobacillus stearothermophilus*.

Tabela 16 – Produção de biossurfactante por *A. thailandense* em meio fermentativo composto por melaço (6 g/L), água residual da produção de azeite (2% v/v) e água de maceração de milho (3 g/L)

Tempo (h)	Açúcar redutor (g/L)	Células viáveis (cel/mL)	Tensão superficial (mN/m)		E ₂₄ (%)
			TS	ΔTS	
0	6,4 ± 0,5	1,4 x 10 ⁶	50,0 ± 1,4	0	0
24	8,9 ± 0,6	2,3 x 10 ⁷	43,5 ± 2,1	6,5 ± 0,7	0
48	6,5 ± 0,4	4,2 x 10 ⁷	35,0 ± 0	15 ± 1,4	0
72	4,8 ± 0	8,8 x 10 ⁶	34,0 ± 0	16 ± 1,4	0
96	4,5 ± 0	7,6 x 10 ⁶	36,5 ± 0,7	13,5 ± 0,7	0
120	3,4 ± 0,5	4,8 x 10 ⁶	34,0 ± 1,4	16 ± 2,8	0
144	2,8 ± 0,4	2,4 x 10 ⁶	34,0 ± 1,4	16 ± 2,8	0

TS: Tensão superficial; ΔTS: Redução da tensão superficial; E₂₄: Índice de emulsão.

O aumento da tensão superficial em 96 horas de fermentação pode estar relacionado a duas hipóteses: consumo do biossurfactante e/ou degradação da molécula, o mesmo fato ocorrido ao meio de cultura 2 desse trabalho. Maass *et al.* (2015) relacionou a queda no rendimento do tensoativo a produção de proteases ou a processos de regulação de síntese do biossurfactante pela bactéria.

Os testes preliminares realizados com as diferentes combinações de resíduos de baixo custo demonstraram que a cepa *A. thailandense* possui a capacidade para produzir uma molécula com propriedades tensoativas e capacidade emulsificante em 24 horas de fermentação. Em condições diferentes para substratos como fonte de carbono (hidrofóbico e hidrofílico) e nitrogênio a levedura foi capaz de reduzir a tensão inicial do meio fermentativo. Baseado nos resultados obtidos a partir do meio composto por água residual da produção de azeite, glicose, extrato de levedura e/ou água de maceração do milho e KH₂PO₄, o estudo dos efeitos destes componentes e a otimização do meio de fermentação foi realizada através de técnicas de planejamento experimental.

5.4 Otimização da composição do meio de fermentação

Os testes mostraram que o meio fermentativo 3 (6g/L de glicose, 3g/L de extrato de levedura, 2% (v/v) OMW e 1g/L de KH₂PO₄) favoreceu uma boa produção de biossurfactante, se comparado aos demais. Portanto foi realizado um estudo dos efeitos destes componentes na redução da tensão superficial do caldo fermentado a

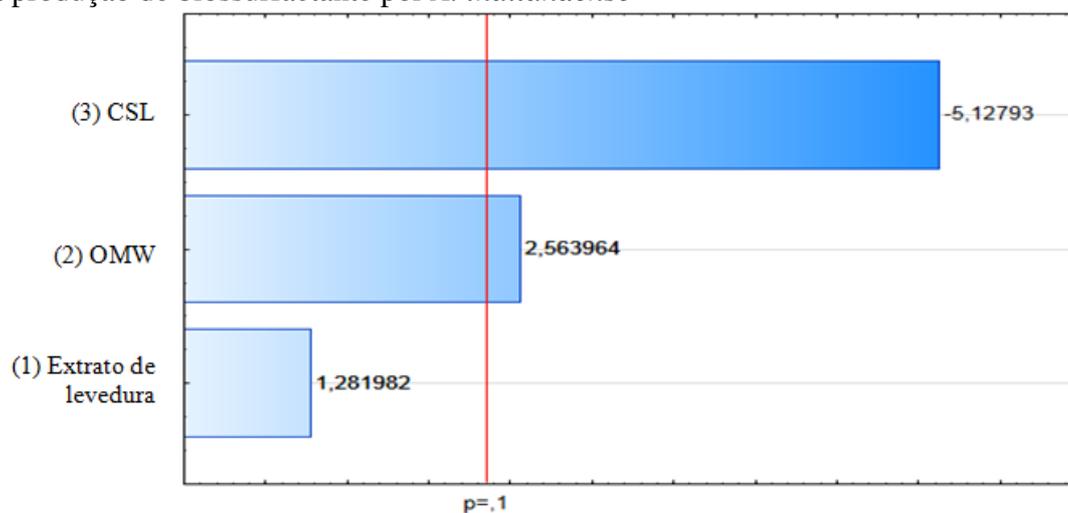
partir das duas fontes de nitrogênio (extrato de levedura e água de maceração do milho) e as concentrações de água residual da produção de azeite (Tabela 17).

Tabela 17 – Valores utilizados no fatorial fracionado (2^{3-1}) para selecionar as variáveis segundo seus efeitos e seus resultados para a redução da tensão superficial do caldo fermentado por *A. thailandense* em 48 horas.

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	OMW (%)	CSL (g/L)	TS _I (mN/m)	TS _F (mN/m)	Δ TS (mN/m)
1	1,0	1,0	2,0	37	33	4
2	2,0	1,0	1,0	49	30	19
3	1,0	3,0	1,0	52	30	22
4	2,0	3,0	2,0	47	34	13
5 (C)	1,5	2,0	1,5	49	33	16
6 (C)	1,5	2,0	1,5	50	32	18
7 (C)	1,5	2,0	1,5	48	30	18

TS_I: tensão superficial inicial; TS_F: tensão superficial final; ΔTS: redução da tensão superficial.

Figura 4 – Diagrama de Pareto com o efeito estimado das fontes de nitrogênio e carbono na produção de biossurfactante por *A. thailandense*



Através do Diagrama de Pareto (Figura 4), observa-se que a água de maceração do milho (CSL) apresentou efeito significativo e negativo e a água residual (*olive mill wastewater* - OMW) apresentou efeito significativo e positivo ($p < 0,1$). A razão entre o carbono e o nitrogênio (C/N) é um dos fatores que mais influenciam a produção do biossurfactante (VELIOGLUE UREK, 2015; ABOUSEOUD *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008). O CSL utilizado possui 75 g/L de carboidratos, este acréscimo de açúcares favorece o aumento do crescimento celular, mas segundo Bajaj *et al.* (2012) simultaneamente reduz a produção do biossurfactante. Outro fator que pode ter

influenciado esse efeito negativo é a relação entre a concentração de nitrogênio e a produção de biossurfactante. Segundo Decesaro *et al.* (2013) a produção de biossurfactante geralmente ocorre em concentrações limitantes de nitrogênio. Esse fato pode estar relacionado com a taxa metabólica de nitrogênio, ou seja, o CSL possivelmente foi uma fonte que proporcionou um metabolismo mais lento do nitrogênio, mas o extrato de levedura foi uma fonte de nitrogênio mais disponível a síntese do biossurfactante. Segundo Kosaric *et al.* (1984) e Santos *et al.*, (2002) o uso de uma fonte lentamente metabolizada, pode ter um efeito semelhante aos baixos níveis de nitrogênio, que reduz a síntese de enzimas envolvidas na produção de lipídeos e consequentemente do biossurfactante. Manivasagan *et al.* (2014) concluiu que o extrato de levedura foi uma boa fonte de nitrogênio para a síntese do biossurfactante por *Streptomyces* sp.

5.4.1 Planejamento experimental para otimização do meio de cultura

Os resultados do planejamento composto central (DCCR) 2² estão descritos nas Tabelas 18 e 19 e suas respectivas superfícies de reposta nas Figuras 9 e 10. Os valores de redução de tensão superficial do meio livre de célula demonstraram que as maiores concentrações de extrato de levedura (4,5 g/L e 5,1 g/L) foram as que resultaram em menor redução da tensão superficial assim como as de OMW (3,0 % e 3,4 %) confirmando que a produção do biossurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio.

Tabela 18 – Valores do planejamento composto central (2²) para produção de emulsão (n-hexadecano) por *A. thailandense* durante 48 horas de fermentação

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	OMW (%)	Índice de emulsão (E ₂₄ %)	
			24 h	48 h
1	1,50	1,00	13,3	40
2	4,50	1,00	16,6	40
3	1,50	1,00	33,3	20
4	4,50	3,00	23,3	66,6
5	3,00	0,58	0	60
6	3,00	3,40	23,3	66,6
7	0,87	2,00	23,3	16,6
8	5,10	2,00	0	50
9 (C)	3,00	2,00	20	63,3
10(C)	3,00	2,00	33,3	60
11 (C)	3,00	2,00	10	63

Tabela 19 – Valores do planejamento composto central (2²) e resultados obtidos de tensão superficial do meio de fermentação para produção de biossurfactante por *A. thailandense* durante 48 horas de fermentação

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	OMW (%)	Tensão superficial (mN/m)				
			TS ₀	TS _{24h}	TS _{48h}	ΔTS _{24h}	ΔTS _{48h}
1	1,50	1,00	60	33	31	27	29
2	4,50	1,00	53	32	30	21	23
3	1,50	1,00	53	31	30	22	23
4	4,50	3,00	50	31	29	19	21
5	3,00	0,58	55	31	30	24	25
6	3,00	3,40	50	30	29	20	21
7	0,87	2,00	55	31	30	24	25
8	5,10	2,00	51	32	30	19	21
9 (C)	3,00	2,00	55	31	29	24	26
10(C)	3,00	2,00	56	29	29	27	27
11 (C)	3,00	2,00	58	31	30	27	28

TS₀: Tensão superficial em 0 horas; ΔTS: redução da tensão superficial

A produção do biossurfactante resultou em bons valores de redução de tensão superficial, na faixa de ΔTS 21 mN/m a 29 mN/m (Tabela 19) a partir de uma fonte de nitrogênio orgânica (extrato de levedura). Fontes *et al.* (2010) em estudo para otimizar a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* reportaram os maiores valores de redução de tensão utilizando 0,5 g/L (extrato de levedura) e 10 g/L (sulfato de amônio), a variação máxima foi de 19,5 mN/m e E₂₄ (81,3%) em 120 horas de fermentação. Mutalik *et al.* (2008) utilizaram duas fontes de nitrogênio orgânicas (extrato de leveduras e peptona) em concentrações de 6,92 g/L e 19,65 g/L, respectivamente em 48 horas de fermentação por *Rhodococcus* spp. Certos microrganismos possuem apenas a capacidade para produzir moléculas com características emulsificante, como reportado por Taran *et al.* (2012) a partir de *Haloarcula* sp. em meio contendo 4% de azeite de oliva (E₂₄= 40%). De acordo com os resultados obtidos a partir do planejamento experimental (Tabelas 18 e 19) pode-se

verificar que a cepa de *Aureobasidium thailandense* produz um surfactante com propriedade tensoativa e bioemulsionante.

O modelo de regressão obtido para prever a redução da tensão superficial está representado pela Equação 2.

$$Z = 17,9 + 3,95x - 0,87x^2 + 5,85y - 1,97y^2 + 0,21xy \quad (2)$$

Onde:

Z = Redução da tensão superficial (mN/m);

Y = Concentração de OMW % (v/v);

X = Concentração de extrato de levedura (g/L).

De acordo com a Tabela 20, o valor de $F_{\text{calculado}}$ (13,47) para o modelo estatístico foi maior que o F_{tabelado} (5,05) ao nível de confiança de 95%. Pode-se concluir que o modelo se ajusta aos dados experimentais ($R^2 = 0,93$), demonstrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados obtidos na Equação 2.

Tabela 20 – ANOVA para produção de biossurfactante por *A. thailandense*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	96,90	5	19,38	
Resíduos	7,19	5	1,438	13,47
Total	104,09	10	10,40	

$F_{5;5;0,05} = 5,05$

As superfícies de resposta apresentam valores de ótimo para a produção do biossurfactantes por *Aureobasidium thailandense*. Os valores de máximo gerado pelo modelo segundo a Figura 5 demonstram que em 24 horas de fermentação a concentração ótima para extrato de levedura será de 2,1 g/L e OMW de 1,4 % para uma resposta de ΔTS 27 mN/m.

Figura 5– Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização das concentrações de extrato de levedura e OMW para produção de biossurfactante por *A. thailandense* em 24 horas

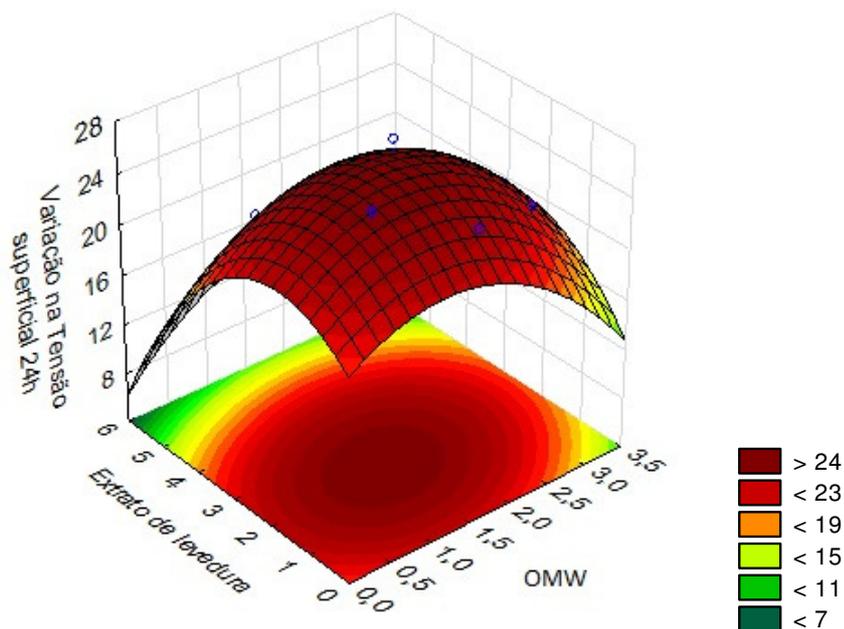
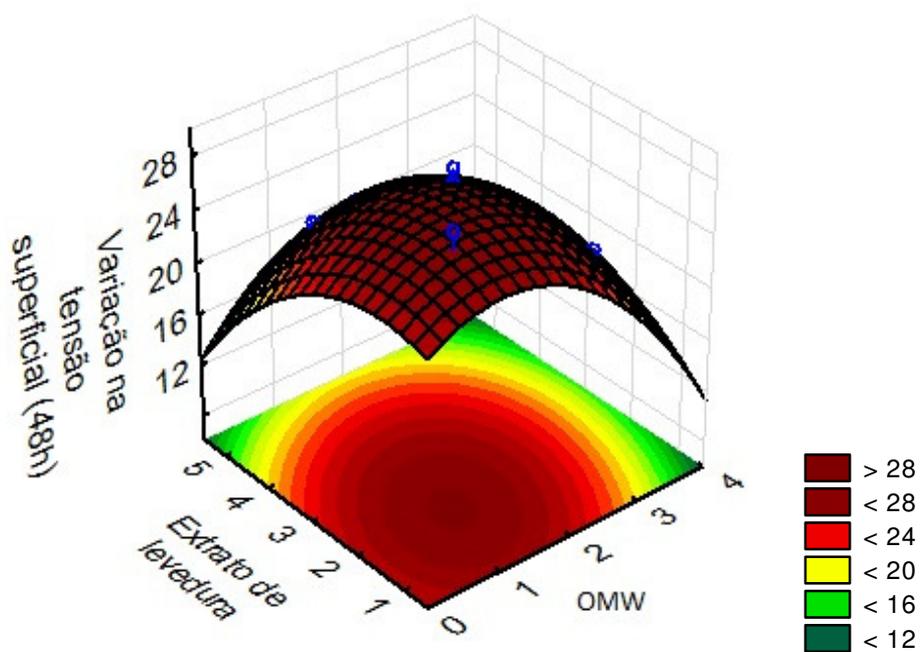


Figura 6 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização das concentrações de extrato de levedura e OMW para produção de biossurfactante por *A. thailandense* em 48 horas



Fontes *et al.* (2012) relataram o aproveitamento de duas fontes de carbono na produção de surfactante por *Yarrowia lipolytica*, o estudo demonstrou que o glicerol e o suco de caju clarificado apresentaram Δ ST de 22 mN/m e 18 mN/m, respectivamente. Valor superior foi obtido por *A. thailandense* em redução da tensão superficial do meio livre de células de 28,2 mN/m, utilizando 1,97 g/L de extrato de levedura e 1,3 % v/v de OMW (1,3 %) otimizadas (Figura 6).

Para a validação do planejamento (DCCR) foi realizado a repetição segundo os valores críticos (valores de máxima resposta de Δ TS) gerados a partir da superfície de resposta. Tais valores para o extrato de levedura e OMW estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21 – Composição do meio de fermentação otimizado para a produção de biossurfactante por *A. thailandense*

Fatores	Concentração
Extrato de levedura	2 g/L*
OMW	1,5% (v/v)*
Glicose	6 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L

*média dos valores críticos gerados pelo planejamento (DCCR) em 24 h e 48 h.

A composição do meio de cultura otimizado reduziu em 66% a concentração de extrato de levedura utilizado nos ensaios iniciais. Verificou-se que a condição de 2 g/L favoreceu o aumento de Δ ST em combinação com 1,5 % de OMW. Pode-se observar que a concentração ideal da fonte hidrofóbica de carbono (OMW), favoreceu o aumento da produção do tensoativo, assim como citado por Bajaj *et al.* (2012) que descreveram a importância desse parâmetro para a síntese de biossurfactante. Essa relação também pode ser descrita a partir do efeito da condição limitante de nitrogênio ao meio e a concentração de OMW, fato esse citado por Mateo e Maicas (2015) como fator relevante para o acréscimo de frações lipídicas, o que pode ter favorecido a produção do biossurfactante nesse estudo.

Os valores de máximo gerados através da superfície de resposta (estimados pelo modelo) apresentaram boa correção com os valores obtidos experimentalmente. Portanto a partir dos valores críticos gerados para o extrato de levedura e OMW é possível obter pontos de máxima redução da tensão superficial (Tabela 22).

Tabela 22 – Resultados da validação do planejamento experimental (DCCR)

Tempo (h)	TS (mN/m)	Δ TS obtida (mN/m)	Δ TS estimada (mN/m)
24	30 ± 0,6	27 ± 2,5 ^{Aa}	27,0 ^{aA}
48	30 ± 0,0	28 ± 2,6 ^{Aa}	28,2 ^{aA}

Valores são média ± desvio. Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). TS: Tensão superficial; ΔTS: redução da tensão superficial. TS_i: 57,6 ± 2,5 mN/m.

De acordo com os valores observados na Tabela 22, o tempo de 24 horas de fermentação foi suficiente para produção do biossurfactante, promovendo a redução máxima da tensão superficial do meio. Esses valores não diferiram significativamente dos estimados pelo planejamento experimental (DCCR). Najafi *et al.* (2011) otimizou a produção com ΔTS de 27 mN/m a partir de *Paenibacillus alve* em 30 horas de fermentação. A cepa de *Aureobasidium thailandense* foi capaz de produzir um bom surfactante com características tensoativas e emulsificante (n-hexadecano) a partir do resíduo da produção de azeite de oliva como fonte de carbono secundária. Não foram encontrados estudos para a levedura *A. thailandense* que possam relacioná-la com sua capacidade de produzir surfactantes, apenas outras espécies como *A. pullulans* (KIM *et al.*, 2015).

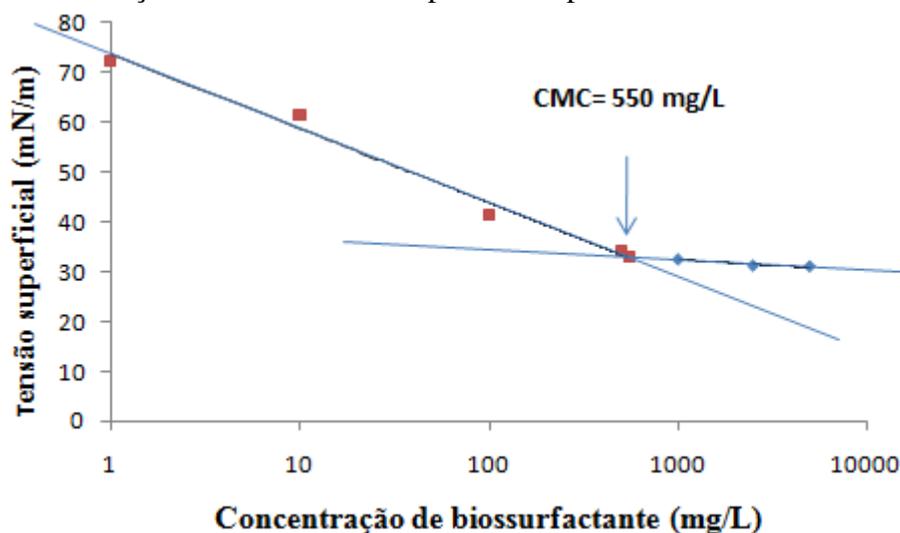
5.5 Caracterização do biossurfactante

5.5.1 Concentração micelar crítica (CMC)

A CMC foi determinada através do biossurfactante bruto, as diluições foram realizadas a partir da solução inicial (5 mg/mL). O biossurfactante produzido por *A. thailandense* apresentou valor de CMC de 550 mg/L, reduzindo a tensão superficial da água de 72 ± 0,8 mN/m para 33 mN/m (Figura 7). A partir desse dado pode-se considerar o biotensoativo um bom agente surfactante, pois reduz a tensão da água a valores próximos de 35 mN/m (DESAI; BANAT, 1997). A produção apresentou rendimento de 139 ± 16 mg/L de biossurfactante bruto durante 48 horas de fermentação. A otimização do meio de cultura na produção de surfactina foi reportado por Liu *et al.* (2012) e Rocha *et al.* (2008) obtiveram rendimento máximo de 134,2 mg/L e 3,5 mg/L, respectivamente.

Bhardwaj *et al.* (2015) obteve um CMC de 330 mg/L a partir de uma nova cultura de *Fusarium proliferatum* reduzindo a tensão da água de 71,2 mN/m para 36,6 mN/m. Oliveira e Cruz (2013) avaliaram a produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* utilizando óleo de fritura como fonte de carbono obtendo CMC de 200 mg/L. O valores de CMC sofrem influência não somente das propriedades da molécula, mas dos fatores relacionados a composição do meio de cultura e o grau de purificação do biossurfactante. Segundo França *et al.* (2015) a produção de surfactina bruta a partir de *Bacillus subtilis* apresentou valor de CMC de 25 mg/L, e quando comparada a surfactina purificada (Sigma) o valor pode aproximar-se a uma faixa de 7,8 – 20,7 mg/L. Portanto o CMC do biossurfactante produzido por *A. thailandense* pode ser reduzido a concentrações menores a partir da molécula do biotensioativo purificada. Assim como foi relatado por Marin *et al.* (2015) onde a produção de surfactina a partir de *Bacillus subtilis* apresentou valores de CMC entre 64 – 1394 mg/L. A CMC desse estudo encontra-se na faixa (1000-2000 mg/L) de alguns surfactantes sintéticos como SDS (docedil sulfato de sódio) e trimetil tetradecil brometo de amônio (TTBA), respectivamente.

Figura 7 – Tensão superficial em função do logaritmo da concentração de biossurfactante produzido por *A. thailandense*.



5.5.2 Fourier espectrometria de infravermelho (FT-IR), Espectrograma de massa e Ressonância magnética nuclear (RMN)

O espectro de FT-IR do biossurfactante está representado na Figura 8 onde são demonstrados os picos referentes aos grupos funcionais atribuídos. O espectro

obtido mostrou os grupos de hidratos de carbono – OH, nas bandas 3285 cm^{-1} . O pico 2953 cm^{-1} foi relacionado ao grupo = C – H atribuídas a ácidos graxos. Nas bandas 1712 cm^{-1} e 1633 cm^{-1} foram confirmadas a presença dos grupos de ésteres insaturados (C = O, - C = C -), o pico 1407 cm^{-1} corresponde ao grupo – CH₂. O último pico 2852 cm^{-1} , de maior absorção foi atribuído a um grupamento éster.

Figura 8 – Espectro de FTIR do biossurfactante produzido por *A. thailandense*. Os grupos funcionais foram atribuídos aos comprimentos de onda 3285 cm^{-1} (– OH), 2953 cm^{-1} (= C – H), 1712 cm^{-1} (C = O), 1633 cm^{-1} (– C = C –), 1407 cm^{-1} (– CH₂) e 2852 cm^{-1} (–C–O–C)

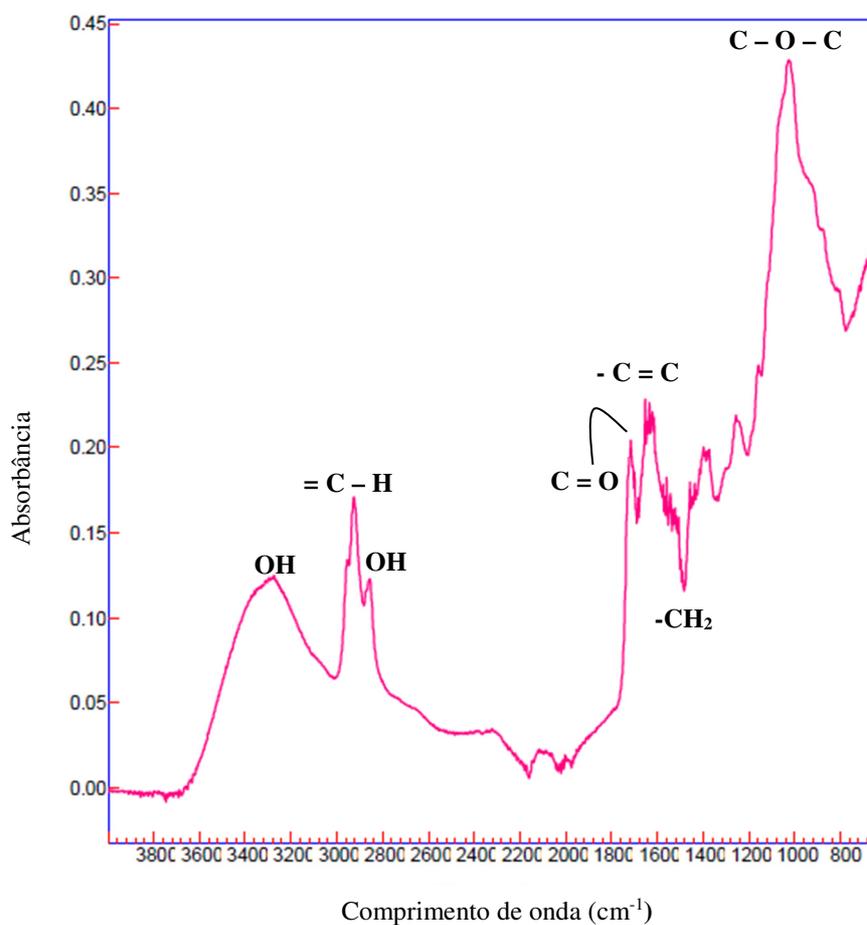
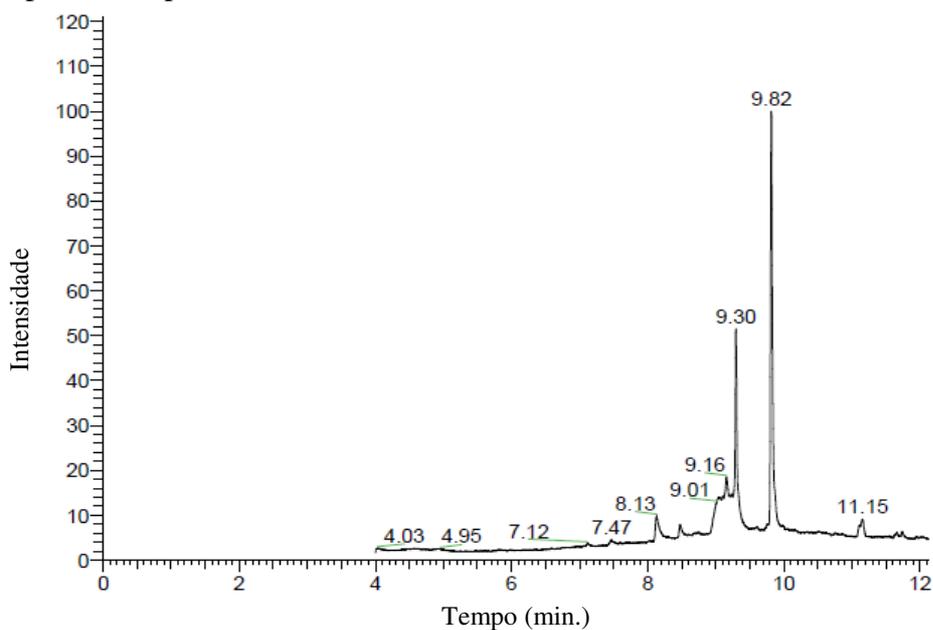
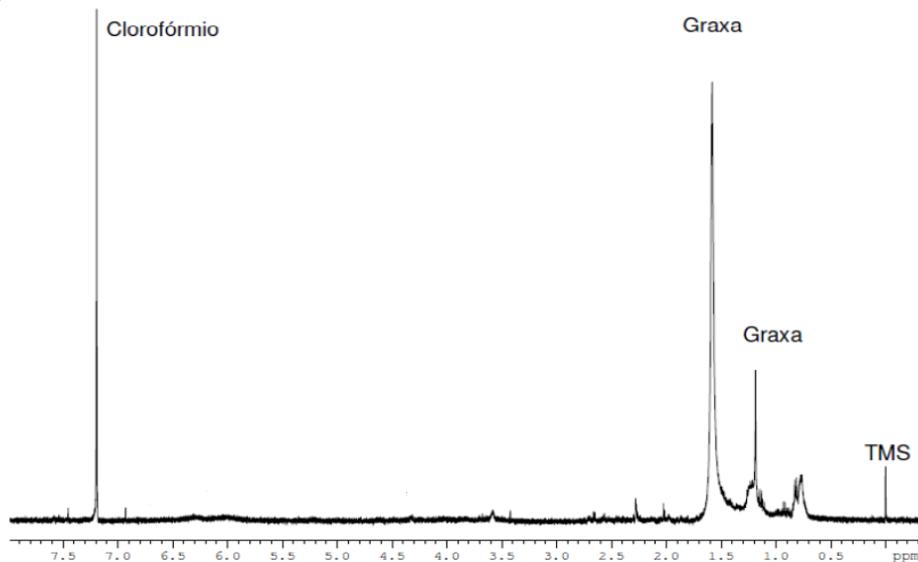


Figura 9 – Espectrograma de massa do biossurfactante produzido por *A. thailandense*



O espectrograma de massa mostrou que a estrutura molecular do biossurfactante é similar a uma molécula de C_{12} , no pico 9,82, o pico 9,30 foi relacionado a impureza do equipamento (Figura 9). Essa estrutura corresponde a $CH_3 - (CH_2)_{10} -$, onde sua porção éster não foi identificada. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) foi aplicada para determinar o grupamento éster. O resultado obtido a partir do biossurfactante bruto está representado na Figura 10.

Figura 10 – Ressonância magnética nuclear (RMN) do biossurfactante produzido por *A. thailandense*



Segundo os espectros de RMN formados pode-se verificar a existência de altas concentrações de impurezas (compostos de natureza graxa, com grupos de CH₂ e CH₃) que provavelmente são remanescentes dos ácidos graxos da OMW que compõe o caldo fermentado. O pico referente ao clorofórmio deve-se ao solvente utilizado para análise. Portanto será necessário utilizar uma amostra do biossurfactante em concentrações mais elevadas, visto que os sinais referentes à molécula tensoativa não foram detectados em relação aos altos picos de compostos interferentes.

De acordo com os resultados obtidos, o biotensioativo é constituído por hidrocarbonetos alifáticos, combinados a uma porção lipídica resultante da presença de grupos ácidos graxos insaturados. Dessa forma a molécula apresenta em sua composição uma porção hidrofóbica e hidrofílica que são característicos de um biossurfactante.

5.6 Aplicação do biossurfactante

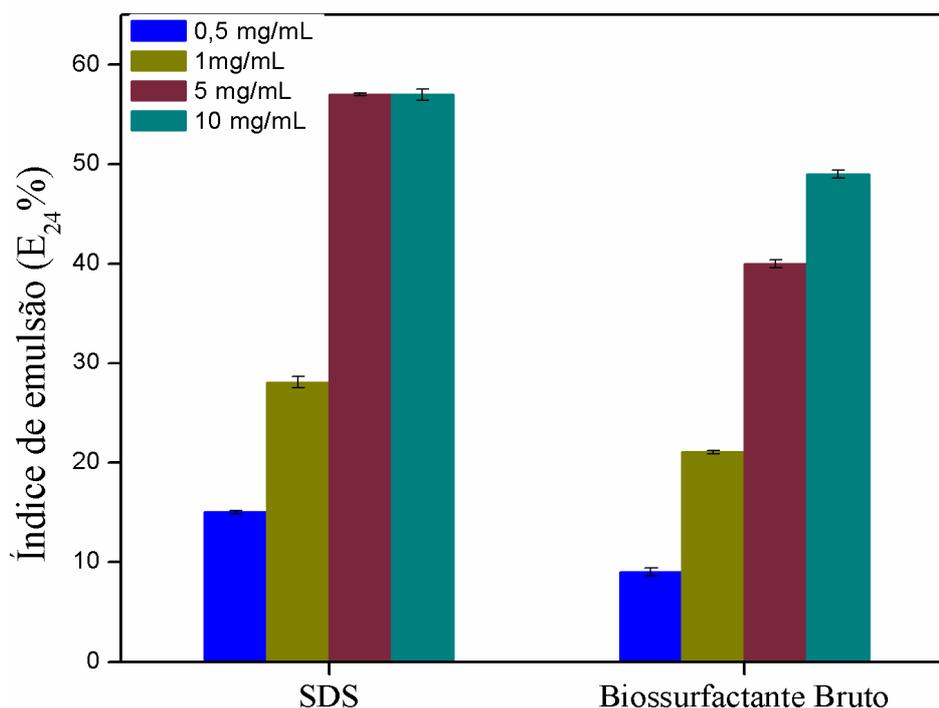
Inicialmente, foi avaliada a capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *A. thailandense* frente a fontes hidrofóbicas (Tabela 23). A partir desse teste pode-se observar o resultado positivo somente para o hexadecano.

Tabela 23 – Avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *A. thailandense*

Compostos hidrofóbicos	Emulsão (E ₂₄ %)
Querosene	Não
Hexadecano	Sim
Azeite de oliva	Não
Óleo de soja	Não
Óleo de milho	Não

A ação do biossurfactante bruto sobre hexadecano foi comparada ao surfactante sintético SDS (docedil sulfato de sódio), ambos em diferentes concentrações como mostra a Figura 11.

Figura 11 – Índice de emulsão ($E_{24}\%$) do biossurfactante bruto produzido por *A. thailandense* comparando sua ação com SDS



O índice de emulsão, $E_{24}\%$ do biossurfactante ($49 \pm 0,4\%$) frente ao hexadecano foi similar ao SDS com $57 \pm 0,57\%$ a partir da concentração de 10 mg/mL. Segundo Jain *et al.* (2012) a capacidade de formar emulsão de modo compatível a outros agentes é uma das características que possibilitam a substituição de surfactantes sintéticos por naturais, favorecendo sua utilização em ambientes aquáticos e na remoção de contaminantes oleosos do solo. Apesar de o biossurfactante apresentar ação inferior ao SDS na concentração de 1 mg/mL, essa diferença pode ser associada ao grau de pureza da molécula, pois o biossurfactante bruto pode ter sua ação comprometida por outros componentes do meio de cultura.

A composição do petróleo bruto inclui frações de compostos alifáticos que compreendem cerca de 40 – 52 % de alcanos, aromáticos de 8 – 10 % e asfaltenos/resinas entre 7 – 22 % (BEZZA *et al.*, 2015). Portanto a avaliação do efeito emulsificante sobre certos hidrocarbonetos é uma medida adequada para seleção de linhagens produtoras de biossurfactantes. Sajna *et al.* (2015) descreveram que o hexadecano possuía a menor taxa de degradação durante o cultivo de petróleo com a levedura produtora de biossurfactante, pois o acréscimo na concentração desse alcano era devido à quebra de hidrocarbonetos de cadeia longa (C_{10} - C_{24}). Esse dado torna-se

atrativo para a aplicação do bioemulsificante em processos similares, que envolvam a formação de emulsão de hexadecano.

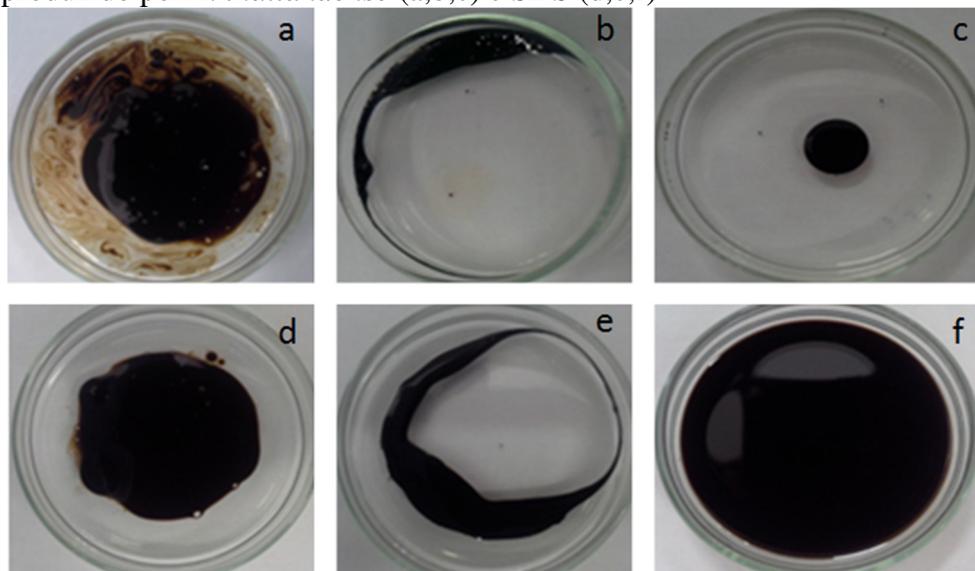
O potencial de dispersão do petróleo foi estudado utilizando água destilada como controle, o surfactante sintético SDS e biossurfactante produzido por *A. thailandense* (Tabela 24). A Figura 12 mostra a formação da zona clara a partir da ação do biossurfactante (b) e após 24 horas de sua formação (c), assim como para o SDS (e, f).

Tabela 24 – Diâmetro da zona clara obtida a partir da dispersão do petróleo bruto após adição do agente tensoativo (10 mg/mL)

Amostras	Diâmetro da zona clara (cm)	Diâmetro da zona clara após 24 horas (cm)
Controle	0,0	0,0
Biossurfactante	$4,2 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$
SDS	$3,6 \pm 0,4$	0,0

Controle: água destilada.

Figura 12 – Teste de dispersão do petróleo bruto utilizando biossurfactante produzido por *A. thailandense* (a,b,c) e SDS (d,e,f)



(a): sem biossurfactante, (b): formação da zona clara após a adição do biossurfactante produzido por *A. thailandense*, (c): zona clara após 24 horas. (d): sem surfactante SDS (e): formação da zona clara após a adição do surfactante SDS, (f): após 24 horas.

Os valores demonstraram que o biossurfactante é um bom agente tensoativo, devido a dispersão quase completa do petróleo se comparado ao sintético SDS. Pode-se verificar que após 24 horas o SDS não foi capaz de estabilizar sua atividade surfactante, o que ocorreu foi a formação da camada de petróleo em toda placa, por uma possível

redução de viscosidade, resultante da ação do SDS (Figura 9f). Rodrigues *et al.* (2006) definiram que a formação de diâmetros mais elevados representam a atividade surfactante frente a hidrocarbonetos. Segundo Rufino *et al.* (2013) a ação do agente dispersante permite a remoção de petróleo minimizando o impacto do derramamento na vida marinha. Os resultados apresentados pelo biotensioativo produzido por *A. thailandense* pode sugerir sua ação frente a outros hidrocarbonetos derivados do petróleo (cadeia carbônica curta) sendo uma alternativa potencial em processos de biorremediação.

6 CONCLUSÃO

A levedura *Aureobasidium thailandense* foi capaz de produzir um biossurfactante com capacidade tensoativa promissora, utilizando resíduo da água residual da produção de azeite (OMW) como fonte de carbono.

O meio de cultura otimizado permitiu uma redução da tensão superficial de 28 mN/ m em 24 horas de fermentação a partir de baixas concentrações de extrato de levedura (2 g/ L) e glicose (6 g/ L), utilizando 1,5% (v/ v) do resíduo da produção de azeite de oliva (*olive mill wastewater*) como fonte de carbono hidrofóbica. O surfactante produzido por *A.thailandense* foi considerado um bom tensoativo reduzindo a tensão superficial da água de 72 mN/m para 33 mN/m, obtendo um CMC de 550 mg/L. A estrutura da molécula corresponde a $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} -$, onde sua porção éster não foi identificada, devido a presença de impurezas remanescentes do meio de fermentação.

Sua capacidade para atuar como agente surfactante também foi atribuída à sua ação eficaz sobre o petróleo bruto, obtendo 86 % de dispersão. Em comparação ao surfactante sintético SDS ($57 \pm 0,57$ %) o biossurfactante apresentou um índice de emulsificação de $49 \pm 0,4$ %, ambos na concentração de 10 mg/mL.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Caracterização da porção éster do biossurfactante;
- Classificar a molécula do biossurfactante;
- Estudo do aumento da escala de produção.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Shafy, H. I.; Schories, G.; Mohamed-Mansour, M.S.; Bordei, V. Integrated membranes for the recovery and concentration of antioxidant from olive mill wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, n. 2, p. 305-314, 2015.
- ABOUSEOUD, M. *et al.* Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, n. 1-3, p. 143–151, mar. 2008.
- ACCORSINI, F.P.; MULTON, M. J. R.; LEMOS, E. G. M.; BENINCASO, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, p.116-125, 2012.
- AL-BAHRY, S. N. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, jul. 2013.
- AL-WAHAIBI, Yahya *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 114, p. 324–33, 2014.
- AYED, Bem.; Hanen *et al.* Characterization and stability of biosurfactant produced by *Bacillus mojavensis* A21 and its application in enhancing solubility of hydrocarbon, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1007–1014, 2014.
- AMARAL, P. F. F. *et al.* Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894–1898, ago. 2006.
- ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Campos Araras, 2004.
- ANTUNES, A. A. *et al.* Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. p. 334–341, 2013.
- APARNA, A; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 95, p. 23–9, 15 jun. 2012.
- AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. *Biotechnology Industrial*, vol. 2. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2001.
- ASSADI, M. M.; TABATABAEE, M. S. Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: a review. *Int. J. Environ. Res.* v. 4, p. 549–572, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry: Vitamins and other nutrients**. Washington: AOAC. Chapter 45, p. 4, 1992.

BARCELOS, G. S *et al.* Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage, **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 49, 2014.

BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced Production of Bioactive Sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by Design of Experiment Approach with Successive Purification and Characterization. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 7, p. 377–386, 2012.

BANAT, Ibrahim M *et al.*, Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production., **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. December, p. 697, 2014.

BEZZA, Fisseha Andualem; BEUKES, Mervyn; CHIRWA, Evans M. Nkhalambayausi, Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation, **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1911–1922, 2015.

BHARDWAJ, G; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran, **RSC Adv.**, v. 5, n. 67, p. 54783–54792, 2015.

BUSTAMANTE, M.; DURÁN, N.; DIEZ, M. C. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil : a review. v. 12, n. 4, p. 667–687, 2012.

MAKKAR, R. S; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications., **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428–34, 2002.

CAO, X. *et al.* Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. **Chemico-biological interactions**, v. 183, n. 3, p. 357–62, 2010.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234–52, mar. 2014.

CERQUEIRA, S. *et al.* Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. v. 9, n. 35, p. 5704–5711, 2010.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 533–540, 6 jul. 2012.

- CHOOKLIN, C. S. *et al.* Utilization of palm oil mill effluent as a novel and promising substrate for biosurfactant production by *Nevskia ramosa* NA3. **Journal Sciences Technology**. v. 35, n. 2, p. 167–176, 2013.
- CORADI, G. V. *et al.* PACWA-PŁOCINICZAK, M. *et al.* Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–54, jan. 2011.
- DE FARIA, A. F. *et al.* Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951–1957, out. 2011.
- DEVELTER, D. W. G.; LAURYSSSEN, L. M. L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 628–638, 19 abr. 2010.
- DOM, M *et al.*, Revalorisation of vine trimming wastes using *Lactobacillus acidophilus* and *Debaryomyces hansenii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 2308, n. , p. 2298–2308, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28, 350–356, 1956.
- DZIĘGIELEWSKA, E.; ADAMCZAK, M. Evaluation of waste products in the synthesis of surfactants by yeasts. **Chemical Papers**, v. 67, n. 9, p. 1113–1122, 19 fev. 2013.
- FOLCH, J. M.; LEES, M, STANLY, H.S. A simple method for the isolation and quantification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509, 1956.
- FONTES, G. C. *et al.* Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 821306, jan. 2010.
- FONTES, G. C. *et al.* Renewable resources for biosurfactant production by *yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 03, p. 483–493, 2012.
- FRANÇA, I. W. L. *et al.* Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils, **Catalysis Today**, v. 255, p. 10-15, 2015.
- FUGUET, E. *et al.* Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, n. 1-2, p. 95–100, ago. 2005.
- GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current opinion in biotechnology**, v. 30C, p. 66–72, 1 jul. 2014.

- GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 298–304, 2010.
- GUDIÑA, E. J. *et al.* Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–75, 2013.
- GUDIÑA, E. J. *et al.* Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil., **Microbial cell factories**, v. 14, p. 14, 2015.
- HASSAN, Mariam *et al.* Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 573–579, 2016.
- HOLANDA, T. N. M. **Isolamento, seleção e identificação de leveduras produtoras de biomoléculas, a partir de resíduos agroindustriais, para uso em processos biotecnológicos.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- HOWARD, G. T. Microbial biodegradation of polyurethane. v. 661, n. 2, p. 215–238, 2011.
- IMURA, T. *et al.* Production of Sophorolipids from Non-edible *Jatropha* Oil by *Stamerella bombicola* NBRC 10243 and Evaluation of their Interfacial Properties. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 10, p. 857–864, 2013.
- IYER, A; MODY, K; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 220–222, 2006.
- JAIN, R. M. *et al.* Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth., **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 4, p. 1110–6, 2012.
- JAIN, R. M. *et al.* Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 52–8, nov. 2013.
- JAMAL, P. *et al.* Isolation and Selection of New Biosurfactant- Producing Bacteria from Degraded Palm Kernel Cake under Liquid State Fermentation. v. 804, n. 8, p. 795–804, 2014.
- JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 110, p. 379–86, 1 out. 2013.
- JARA, A. M. A T.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 101, p. 315–8, 1 jan. 2013.

KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Experimental Biology Science**, n. 4, p. 1–8, 2013.

KARDENA, E.; HELMY, Q.; FUNAMIZU, N. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. **Int. J. Biotechnology**, v. 12, p. 66 – 86, 2011.

KIM, J. S.; LEE, I. K.; YUN, B. S. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122917, jan. 2015.

KOSARIC, N *et al.* The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production, **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 11, p. 1735–1743, 1984.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265–275, 1951.

LIU, X. *et al.* Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. **PloS one**, v. 7, n. 5, p.34430, jan. 2012.

LIU, Xiaoyan *et al.* Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins, **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 154–160, 2015.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAD, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*, 12ed. p.150, 2010.

MANN, Jacinta *et al.* Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrena consors*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 138–145, 2015.

MANIVASAGAN, P. *et al.* Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 5, p. 783–97, maio 2014.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 5, jan. 2011.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–65, nov. 2012.

MARIN, C. P.; KASCHUK, J. J.; FROLLINI, E.; NITSCHKE, M. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production, **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 239–245, 2015.

MAASS, Danielle *et al.* Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2015.

MATEO, J. J.; MAICAS, S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies, **Food Research International**, v. 73, p. 13–25, 2015.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v. 31, p. 426–428, 1959.

MIRONCZUK, A. M. *et al.* A two-stage fermentation process of erythritol production by yeast *Y. lipolytica* from molasses and glycerol, **Bioresource Technology**, v. 198, p. 445–455, 2015.

MULLIGAN, C.N; YONG, R.N; GIBBS, B.F, Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, **Engineering Geology**, v. 60, n. 1-4, p. 371–380, 2001.

MUTALIK, S. R. *et al.* Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. **Bioresource technology**, v. 99, n. 16, p. 7875–80, nov. 2008.

MARTI, M. E. *et al.* Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and microbial technology**, v. 55, p. 31–9, 5 fev. 2014.

MATSUMIYA, Y. *et al.* Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1946–53, jun. 2010.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products., **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 1, p. 4116, 2015.

NAJAFI, a R *et al.* Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well., **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 33–9, 2011.

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

NOPARAT, P.; MANEERAT, S.; SAIMMAI, A. Application of biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the biodegradation of used lubricating oil., **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3949–63, 2014.

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, n. February, p. 155–160, 2013.

PERFUMO, A. *et al.* Possibilities and Challenges for Biosurfactants Use in Petroleum Industry, 2010.

PETERSON, S. W; MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T. D. *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces., **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt 2, p. 790–5, 2013.

PONTE ROCHA, M. V. *et al.* Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 155, n. 1-3, p. 366–78, maio 2009.

PRICE, N **biosurfactant**. P. J. *et al.* Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. **Carbohydrate research**, v. 370, p. 24–32, 5 abr. 2013.

ROCHA, P.; BARRETO, R. V. G.; MELO, V.M. M.; L. R. B. GONÇALVES. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 155, p.366–378, 2009.

SEKHON RANDHAWA, K. K; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market., **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. September, p. 454, 2014.

REZNIK, G. O. *et al.* Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1387–1397, 2010.

RODRIGUES, L. R. *et al.* Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, n. 1, p. 79–86, 2006.

RODRIGUES, L. R. Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors., **Journal of colloid and interface science**, v. 449, p. 304–16, 2015.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; LEGMANN, R.; RON, E. Z. Purification and Chemical Properties of *Acinetobacter calcoaceticus*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 323–326, 1988.

ROSERO, N.; PIMIANTA, A.; DUGARTE, F.; CARVAJAL, F. Parameters examination a biosurfactant production at laboratory scale. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 2, p. 35–42, 2003.

RUFINO, R.D. *et al.* Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*, **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, p. 117–122, 2013.

RUFINO, R. D. *et al.* Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34–38, jan. 2014.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 729–734, 17 out. 2006.

YAI, Hat. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates, v. 94, n. 3, p. 275–284, 2013.

SAIMMAI, Atipan *et al*, Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant-producing bacteria, **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1669–1679, 2012.

SANTOS, A. S. *et al*. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 223, n. 3, p. 143–151, 2002.

SAIKIA, R. R. *et al*. Achieving the Best Yield in Glycolipid Biosurfactant Preparation by Selecting the Proper Carbon/Nitrogen Ratio. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, n. 3, p. 563–571, 1 set. 2013.

SAKTHIPRIYA, N; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. International Biodeterioration & Biodegradation Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraf fi ns, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 168–177, 2015.

SAJNA, Kuttuvan Valappil *et al*. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth, **Bioresource Technology**, v. 191, p. 133–139, 2015.

SAJNA, K. V. *et al*. Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 85–92, set. 2013.

SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H.; VALLE, A.B.F.; OLIVEIRA, M.L.C. **Cursos práticos em bioquímica**. Instituto de Química-UFRJ. 6^a ed. 1996.

SOLAIMAN, D. K. Y. *et al*. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 9, p. 1341–7, set. 2007.

SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 49, jan. 2011.

SEM, R. Biosurfactants. Editora Springer, vol. 672, New York, 2010.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. v. 2014, 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

VAN, H.; VANZEVEEREN, E.C.A. Rhamnolipids in bakery products. W. O. 2004/040984, International Application Patent (PCT), Washington, DC., USA, 2004.

VELIOGLU, Z.; OZTURK UREK, R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. xx, n. xx, 9 abr. 2015.

XUE, J. *et al.* Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review, **Current Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 220–228, 2015.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**. 27, 146–154. 2005.

WILLENBACHER, J. *et al.* Evaluation of different *Bacillus* strains in respect of their ability to produce Surfactin in a model fermentation process with integrated foam fractionation., **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9623–32, 2014.

WU, J.Y. *et al.* Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource technology**, v. 99, n. 5, p. 1157–64, 2008.