

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
*CANDIDA LIPOLYTICA***

RAQUEL DINIZ RUFINO

**RECIFE
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
CANDIDA LIPOLYTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, nível mestrado, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

RECIFE

2006

Rufino, Raquel Diniz

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* / Raquel Diniz Rufino. – Recife : O Autor, 2006.

97 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Micologia aplicada. 2. *Candida lipolytica* – Produção de biossurfactate – Resíduo industrial – Otimização – Planejamento fatorial. I. Título.

582.28

579.55

CDU (2.ed.)

CDD (22.ed.)

UFPE

BC2006-108

RECIFE

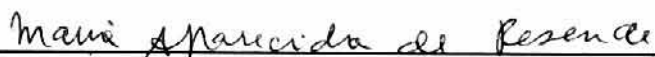
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *CANDIDA LIPOLYTICA*

Raquel Diniz Rufino

COMISSÃO EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

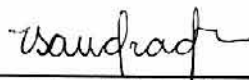


Profa. Dra. Kátia Maria Gomes Machado
Universidade Católica de Santos, Santos, SP

Suplentes:



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



Profa. Dra. Vânia de Souza Andrade
Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL

**“Lâmpada para os meus pés é a
tua palavra, e luz para o meu caminho” (Salmos 119:105)**

**Aos meus pais, Renivaldo e Cosma,
pelo amor e exemplo de vida. A Joran,
meu querido irmão, pelo incentivo em
todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos em todos os momentos;

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pelo exemplo de força e dedicação; pela orientação e oportunidade de realizar um grande sonho;

À Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, pelos ensinamentos, carinho e amizade desde a iniciação científica;

Ao Prof. Dr. Benício de Barros Neto, pela atenção, orientação e por tornar a estatística uma ferramenta acessível e agradável;

À Petrusk H. Campos Marinho, pelo amor, carinho e por compartilhar comigo todas as alegrias e dificuldades durante todo esse tempo em que estamos juntos;

Aos meus queridos tios, tias, primos e primas, pelo apoio, apesar da distância;

À Carolina Gusmão, pela amizade, atenção e colaboração nos momentos mais necessários; Charles Bronzo, pela descontração e alegria que nos contagia e Juliana Luna pela convivência durante todos esses anos;

Ao Dr. Ricardo Kenji, por sua atenção em todos os momentos; Dra. Luciana Franco e Dra. Thayza Stamford que apesar das ocupações com o término do doutorado sempre me dispensaram atenção e carinho;

As minhas queridas amigas Ana Valéria, Roberta, Roselyne, Rosilda e Thaís, pela amizade desde a graduação;

Aos colegas do NPCIAMB, Adriana, Fabíola, Luíza, Marcos Lima, Marcos Moraes, Patrícia, Norma Evangelista, por me ajudar nos momentos finais da dissertação, e Raphael Neves, aluno da iniciação científica júnior, por sua especial dedicação e inestimável ajuda;

Aos colegas do Mestrado em Biologia de Fungos, pelos momentos de estudo e de alegria; em especial à Marta, por transmitir força e confiança sempre;

A Sra. Kátia e Sr. Pedro Marinho, Kaline e Francisco Santiago e aos queridos Luan e Pedro Victor por ser uma família tão especial e exemplo de amizade;

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Pe. Theodoro Peters, pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB;

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, nas pessoas da Profa. Dra. Leonor Costa Maia e da Profa. Dra. Norma Gusmão, pela atenção que sempre me dispensaram;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, em especial à Professora Dra. Maria Auxiliadora Cavalcanti por sua atenção e apoio;

Aos Professores do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, Dra. Alexandra Amorim, Dra. Aline Elesbão, Dra. Arminda Messias, Dr. Carlos Alves, Dra. Clarissa Albuquerque e Dra. Kaoru Okada, pelo exemplo de profissionalismo;

À Giovanna Guterres, secretária da Pós-graduação em Biologia de Fungos, pela presteza em seus serviços;

À Sônia Maria de Souza, secretária do NPCIAMB pela atenção e presteza em seus serviços; e aos técnicos do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim de Santana, pelo apoio nos experimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo, e ao CTPETRO e FINEP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Biossurfactantes	16
2.1.1 Tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)	17
2.2 Função fisiológica dos biossurfactantes	19
2.3 Perspectivas econômicas	20
2.4 Produção de biossurfactantes utilizando resíduos oleosos	21
2.5 Aplicações dos biossurfactantes	24
2.6 Vantagens dos biossurfactantes	26
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ARTIGO I	
Produção de biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> utilizando resíduo da refinaria de óleo vegetal e extrato de levedura como substrato	39
ARTIGO II	
Produção de biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> utilizando ácido glutâmico e resíduo da refinaria de óleo vegetal como substratos	60
CONCLUSÕES	96
ANEXOS	97

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Força de atração existente entre as moléculas dos líquidos	18
Figura 2 – Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida: a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas	18
Figura 3 – Formação de micelas na CMC	19

ARTIGO I

Figura 1 - Crescimento, pH e redução da tensão superficial durante o crescimento de <i>Candida lipolytica</i> em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extrato de levedura	53
Figura 2 - Emulsificação de hidrocarbonetos pelo biossurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura	54
Figura 3 - Influência do tempo na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura	55
Figura 4 - Influência da temperatura na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura	56

Figura 5 - Influência de diferentes concentrações de NaCl na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extrato de levedura	57
Figura 6 - Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extrato de levedura	58

ARTIGO II

Figura 1 - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados das diferentes variáveis testadas na produção de biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> , após 72 horas de cultivo. As variáveis testadas foram: (1) resíduo, (2) ácido glutâmico e (3) extrato de levedura. Os efeitos dos compostos foram estatisticamente significativos para $p < 0,05$	89
Figura 2 - Superfície de resposta de um modelo quadrático ajustado aos dados dos planejamentos fatoriais 3, 4 e 5 tendo como variável resposta a tensão superficial após 72 horas de cultivo de <i>Candida lipolytica</i>	90
Figura 3 - Cinética de crescimento da <i>Candida lipolytica</i> , pH e tensão superficial do líquido metabólico obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)	91
Figura 4 - Produção do biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> determinada pela atividade de emulsificação do líquido metabólico obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)	92

Figura 5 - Influência da temperatura na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da determinação da tensão superficial do líquido metabólico de <i>Candida lipolytica</i> , obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)	93
Figura 6 - Influência do pH na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico de <i>Candida lipolytica</i> , obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)	94
Figura 7 - Influência da concentração de NaCl na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico de <i>Candida lipolytica</i> , obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)	95

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Tensões superficiais do líquido metabólico de bactérias, leveduras e de alguns surfactantes sintéticos	26
---	----

Tabela 2 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	28
--	----

ARTIGO I

Tabela 1 – Composição do resíduo da refinaria de óleo vegetal	59
---	----

ARTIGO II

Tabela 1 - Valores das variáveis independentes, do primeiro planejamento fatorial, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo	84
--	----

Tabela 2 - Valores das variáveis independentes, do segundo planejamento fatorial, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo	85
---	----

Tabela 3 - Valores das variáveis independentes, do terceiro planejamento, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo	86
---	----

Tabela 4 - Valores das variáveis independentes, do quarto planejamento, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo	87
---	----

Tabela 5 - Valores das variáveis independentes, do quinto planejamento, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo	88
---	----

RESUMO

A produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP0988 foi inicialmente estudada em meio mineral contendo resíduo de refinaria de óleo de soja como substrato de baixo custo. Os resultados obtidos demonstraram um rendimento de 4,5 g/L de biossurfactante, com redução da tensão superficial do meio para 32 mN/m. O biossurfactante isolado apresentou 50% de proteínas, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos em sua constituição. A otimização da produção do biossurfactante foi realizada a partir de planejamentos fatoriais sequenciais. O primeiro planejamento foi estabelecido utilizando-se três variáveis: resíduo industrial, extrato de levedura e ácido glutâmico. Considerando os resultados obtidos, outros planejamentos foram realizados excluindo-se o extrato de levedura do meio de cultivo. Os resultados posteriores demonstraram que as melhores concentrações de resíduo industrial e de ácido glutâmico foram de 6% e 1%, respectivamente, favorecendo a redução da tensão superficial do meio para 26 mN/m. A cinética de produção do biossurfactante obtido no meio otimizado foi avaliada durante 72 horas a 150 rpm e 28°C. O biossurfactante formou emulsões estáveis de 4,5 Unidades de Atividade de Emulsificação. Durante a fase estacionária de crescimento, enquanto que a tensão superficial do líquido metabólico livre de células apresentou alterações insignificantes frente a diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl. O biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, cultivada em meio de baixo custo representa uma alternativa de produção de um biopolímero estável, com perspectivas de aplicações futuras no controle da poluição ambiental causada por petróleo e derivados.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, resíduo industrial, biossurfactante

ABSTRACT

The production of biosurfactants by *Candida lipolytica* UCP0988 was first studied in a mineral medium supplemented with a ground-nut oil refinery residue as low-cost substrate. The results obtained showed a yield of 4.5 g l^{-1} , with a reduction of the medium surface tension for 32 mN m^{-1} . The isolation of the biosurfactant showed the presence of 50% of proteins, 20% of lipids and 8% of carbohydrates. The optimization of biosurfactant production was carried out by the use of sequential factorial designs. The first factorial design was established by using three variables: industrial residue, yeast extract and glutamic acid. According to the results obtained, others designs were developed excluding the yeast extract from the medium of cultivation. The results obtained showed that the best concentrations of the residue and of the glutamic acid were 6% and 1%, respectively, favoring the reduction of the surface tension of the medium to 26 mN m^{-1} . The kinetics of biosurfactant production in the optimized medium was evaluated during 72 hours at 150 rpm and 28°C . The biosurfactant formed stable emulsions of 4.5 U.A.E during the stationary growth phase, while the surface tension of the cell-free broth showed only little changes when submitted under different temperatures, pH's and NaCl concentrations. The biosurfactant produced by *C. lipolytica* cultivated in low-cost medium represents an alternative of a stable biopolymer, permitting future applications in the control of environmental pollution caused by petroleum and derivates and in the industries of the country.

Keywords: *Candida lipolytica*, industrial residue, biosurfactant

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos, amplamente utilizados em diversos setores industriais, como na indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo, ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, em produtos de higiene e cosméticos, na indústria de papel, têxtil e de cerâmica (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Os surfactantes, como moléculas anfipáticas, são constituídos por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, onde a porção apolar é uma cadeia hidrocarbonada e a polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica) não iônica ou anfotérica. Em função da presença dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, esses compostos tendem a se distribuir nas interfaces, com diferentes graus de polaridade (água-óleo ou ar-água), formando um filme molecular, reduzindo, desse modo, a tensão interfacial e superficial. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para várias aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (MAYER; SOBERON-CHAVES, 2000; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Vários compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo considerados surfactantes naturais. Dentre as leveduras, representantes do gênero *Candida*, têm sido utilizadas na emulsificação e solubilização de substratos insolúveis, como hidrocarbonetos, através da produção de biossurfactantes. Essas substâncias de origem microbiana têm atraído grande atenção devido às suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e habilidade de serem produzidas a partir de fontes renováveis e de baixo custo (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985; ALEXOPOULOS et al., 1996; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem fosfolipídeos, ácidos graxos hidroxilados, glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (LIN, 1996).

Candida lipolytica vem sendo utilizada com sucesso devido ao potencial em

produzir biopolímeros, com alta atividade de emulsificação, utilizando substratos regionais como fonte de carbono. Recentemente, pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos regionais e glicose demonstraram a produção desses compostos (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP, 2000; SARUBBO et al., 2001; VANCE-HARROP et al., 2003; RUFINO et al., 2003; VANCE-HARROP, 2004). Os biossurfactantes têm sido testados em muitas aplicações ambientais, como na biorremediação, na dispersão de manchas oleosas e na recuperação de petróleo, substituindo os surfactantes químicos. Além disso, também, podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética, de detergentes e agrícola (TULEVA et al., 2002).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser aplicados em uma variedade de processos industriais; entretanto, ainda não são amplamente utilizados, devido aos altos custos de produção, associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos dispendiosos (RON; ROSENBERG, 2001; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Uma possível solução seria o uso de subprodutos industriais, a exemplo, a borra residual da indústria de óleos vegetais. Adicionalmente, a manipulação da composição do meio de cultura, também pode permitir o aumento da produtividade, otimizando, dessa forma, as condições de cultivo (GALLERT; WINTER, 2002; TULEVA et al., 2002; RUFINO et al., 2005a).

Neste contexto, a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*, a partir de resíduos industriais, representa uma alternativa para a produção de biopolímeros com atividade de emulsificação, possibilitando aplicações futuras no controle da poluição causada por petróleo e derivados, em ecossistemas terrestres e aquáticos. Assim, as concentrações ideais dos substratos foram estabelecidas através de planejamentos fatoriais, visando minimizar os altos custos de produção. A otimização da produção permitiu realizar o estudo da cinética de crescimento e de produção do biossurfactante, bem como, a determinação da estabilidade do biopolímero.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biossurfactantes

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos utilizados em diversas aplicações (ROSENBERG, 1986). A maioria dos surfactantes disponíveis são sintetizados a partir de derivados do petróleo. Contudo, a preocupação ambiental levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (ROBERT et al., 1991; BANAT, 1995; SARUBBO et al., 1997).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, promove a redução da tensão interfacial e superficial. Esta propriedade faz os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BOGNOLO, 1999). A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (BANAT et al., 2000).

Vários compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídeos) e também pelo ser humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (BANAT et al., 2000).

Atualmente, nos países industrializados 70 – 75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica (NITSCHKE; PASTORE, 2002; NITSCHKE et al., 2004).

Entretanto, as indústrias, pressionadas pelas organizações de defesa do meio ambiente estão muito interessadas em encontrar uma forma de produzir surfactantes menos tóxicos (DELEU; PAQUOT, 2004). Esta tendência é movida pela necessidade da criação de produtos mais brandos, para a substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados), como também para aumentar a especificidade dos produtos (URUM; PEKDEMIR, 2004).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Os microrganismos sintetizam os biossurfactantes, geralmente durante o crescimento em substratos imiscíveis em água (MULLIGAN, 2005).

A utilização de técnicas para obtenção de surfactantes a partir de microrganismos representa um elevado interesse no campo aplicado (SEN; e SWAMINATAN, 2005). Vários produtos microbiológicos com propriedades surfactantes foram identificados no passado. Entre os diversos microrganismos estudados para a produção de biossurfactantes estão o *Arthrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Candida lipolytica* e *Torulopsis bombicola* (MULLIGAN, 2005).

2.1.1 Tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A tensão superficial é a força de atração, existente entre as moléculas dos líquidos (Figura 1). A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (Figura 2). A concentração dessas micelas forma a CMC. Esta concentração corresponde à mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (Figura 3).

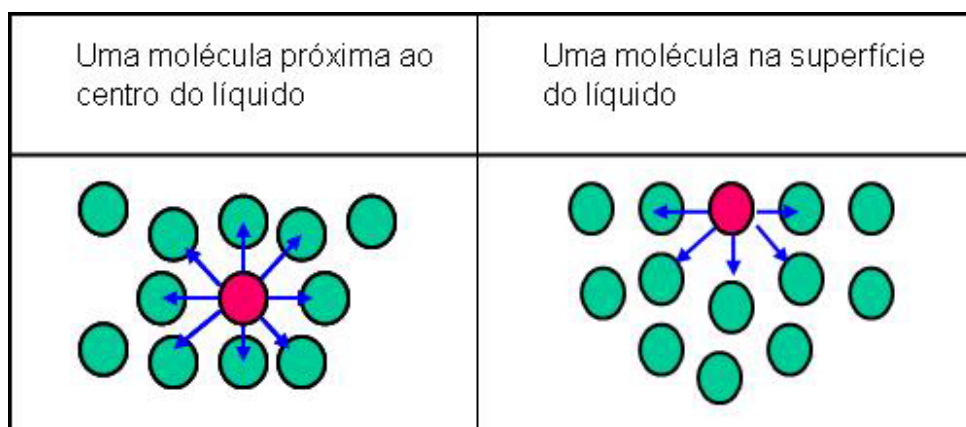


Figura 1 – Força de atração existente entre as moléculas dos líquidos

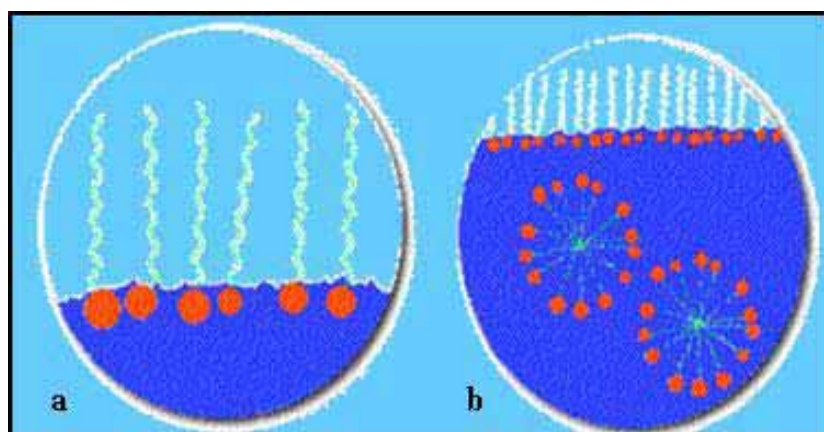
Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

Figura 2 - Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida:

a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

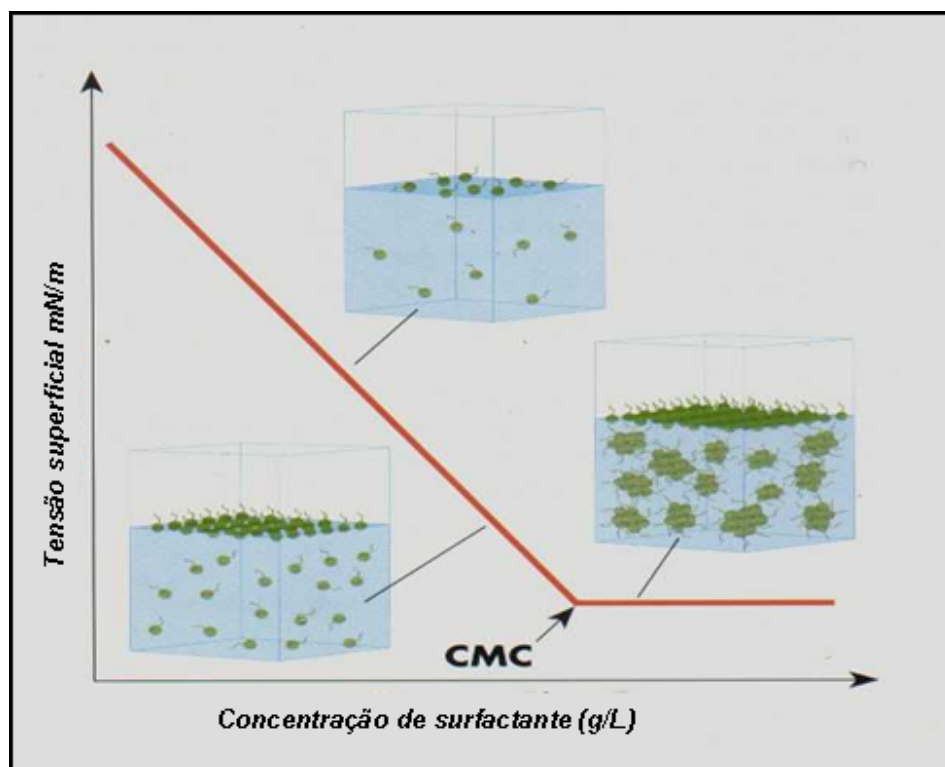


Figura 3 - Formação de micelas na CMC

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.net>

2.2 Função fisiológica dos biossurfactantes

Embora, a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas, como:

- transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis* (COOPER et al., 1981), onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo - ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos;

- emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (COOPER et al., 1981). Porém, cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfactantes apenas em substratos hidrossolúveis (FRANCY et al., 1991);

- atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. Os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* e o surfactin de *B. subtilis*, funcionam como antibióticos solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996);

- aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. Os elementos chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células a superfícies. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1998).

2.3 Perspectivas econômicas

Os processos biotecnológicos são considerados operações onerosas especialmente no caso da produção de biossurfactantes (SANTA ANNA et al., 2005). Contudo, o sucesso da produção dos biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos de baixo custo e da utilização de matérias primas que não ultrapassem 10 – 30% do custo total (COOPER et al., 1981). Os biossurfactantes competem com dificuldade com os surfactantes petroquímicos, devido a três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção. O grande custo de produção é bem tolerado para biossurfactantes usados em pequenas quantidades em produtos caros, como cosméticos, medicamentos, entre outros. Mas, em outras aplicações, como a recuperação de óleos, os altos custos de produção são incompatíveis (PANDEY et al., 2000).

Makkar; Cameotra (2002) sugeriram alguns fatores que poderiam ser enfocados na redução dos custos de produção dos biossurfactantes:

microrganismos modificados geneticamente; o processo de produção, que pode ser manipulado para redução dos custos operacionais; a utilização de substratos renováveis, como fonte nutritiva para os microrganismos; os processos de recuperação dos biossurfactantes podem ser substituídos por técnicas simples. Os métodos de recuperação mais comuns são as extrações com solventes, como clorofórmio-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano, ácido acético ou precipitação ácida. Contudo, esses métodos de recuperação podem ser substituídos por métodos mais simples, como centrifugação, cristalização, adsorção e ultra-filtração (COOPER et al., 1981).

Milhões de toneladas de resíduos industriais são gerados e rejeitados no meio ambiente todos os anos podendo, na grande maioria das vezes serem reutilizados. Pesquisas visando selecionar substratos adequados e de baixo custo para a produção de biossurfactantes, destacam os resíduos agro-industriais, como os do processamento dos óleos de soja, milho, coco, amendoim e canola, gorduras animais, açúcar de beterraba, sorgo, casca de soja, bagaço da cana-de-açúcar e resíduos do processamento de algumas frutas como maçã, banana e abacaxi (GALLERT; WINTER, 2002).

2.4 Produção de biossurfactantes utilizando resíduos oleosos

O mundo produz em torno de 2,5-3 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, e em torno de 75% dessa produção é derivada de plantas (HABA et al., 2000). Muitos óleos e gorduras são utilizados na indústria de alimentos, gerando grande quantidade de resíduos. A disposição dos resíduos é um problema crescente, que desperta o interesse da utilização deles para transformação microbiana.

Mercade et al., (1993) relataram o uso de efluente da indústria de óleo de oliva (OOME) como novo substrato para produção de biossurfactantes (ramnolipídeos), por *Pseudomonas* sp. Esse efluente é um dos maiores poluentes da indústria agrícola na região mediterrânea, é uma substância escura contendo frações solúveis em água e resíduos da extração do óleo de oliva. OOME contém substâncias tóxicas

semelhantes a polifenóis e outras substâncias orgânicas (20 – 80 g/L), compostos nitrogenados (12 – 24 g/L), ácidos orgânicos (5 – 15 g/L) e óleos residuais (0,3 – 5 g/L). Das vinte e duas espécies de *Pseudomonas* testadas, apenas quinze apresentaram um bom crescimento e uma redução na tensão superficial para 30 mN/m (MERCADE et al., 1993).

Resíduos de óleos lubrificantes causam sérios problemas ao meio ambiente, a partícula de óleo pode se juntar à matéria orgânica, a partículas minerais e a organismos, sendo assim uma ameaça ao meio ambiente (SANTA ANNA et al., 2005). Bento; Gaylarde (1996) observaram a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas* em meio mineral com glicose e óleo diesel. Em um estudo similar Muriel et al., (2002) observaram a produção extracelular de biossurfactante por *Cladosporium resinae*. Essa produção foi observada através da redução da tensão superficial e da formação de emulsões.

Mercade et al., (1996) relataram a seleção de microrganismos capazes de utilizar resíduos de óleos lubrificantes para produção de biossurfactantes. De dezoito amostras de solo contaminadas por hidrocarbonetos, quarenta e quatro isolados diferentes foram capazes de crescer em meio contendo óleo lubrificante como fonte de carbono. Apenas 10% das espécies isoladas produziram biossurfactantes.

Sarubbo et al., (1997) avaliaram a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *Candida lipolytica* (1055 e 1120) utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono. A produção de bioemulsificantes foi observada na fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária.

Em outro estudo utilizando uma espécie de *Pseudomonas* 42A2 crescida em meio contendo um sub-produto do processamento de óleos vegetais, com alta concentração de ácido oléico (98% m/m), Mercade et al., (1997) observaram uma diminuição na tensão superficial do meio de cultura de 55 mN/m para 32 mN/m, e a tensão interfacial de 24 mN/m para 5 mN/m, devido a produção de um novo biossurfactante, caracterizado como ácido 7,10 diidroxi-8E-octadecanóico.

Vollbrecht et al., (1999) estudaram a produção de biossurfactantes utilizando óleos vegetais domésticos. Em seus estudos com *Tsukamurella* DSM 44370, eles

obtiveram um bom crescimento e uma boa produção de glicolipídeos em meios contendo óleos vegetais naturais, melhor que os resultados obtidos em meios complexos. O óleo de girassol apresentou um rendimento de produção em torno de 5g/L de glicolipídeos.

Estudos sobre as propriedades físico-químicas dos glicolipídeos produzidos por *Tsukamurella* demonstraram que o glicolipídeo GL1 reduziu a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m, com uma concentração micelar crítica com valor de 10 mg/L. Os glicolipídeos GL2 e GL3 reduziram a tensão superficial da água para 23 mN/m e 24 mN/m, respectivamente (VOLLBRECHT et al., 1999).

Haba et al., (2000) realizaram a seleção de 36 microrganismos para produção de biossurfactantes em meio de cultura líquido, contendo 2% de resíduo de óleo de oliva ou óleo de girassol como fonte de carbono, baixando a tensão superficial para 40 mN/m, essa medida foi utilizada como critério de seleção. Após 72 horas de crescimento muitas espécies de *Pseudomonas* testadas apresentaram crescimento satisfatório, sendo o óleo de oliva o melhor substrato para o crescimento celular e para a produção de biossurfactante, a menor tensão superficial foi de 35 mN/m. Os biossurfactantes produzidos foram ramnolipídeos. Outras espécies foram testadas (*Rhodococcus* sp., *Acinetobacter calcoaceticus* e *Candida* sp.) mas os resultados obtidos não foram comparáveis com os resultados obtidos por *Pseudomonas* (HABA et al., 2000).

Biossurfactantes foram produzidos comercialmente por *Pseudomonas*, com níveis superiores a 100 g/L (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000). O nível de produção e a combinação com o uso de substratos renováveis e de baixo custo, como os resíduos orgânicos, tornam competitivo o custo de produção dos biossurfactantes com o custo de produção dos surfactantes sintéticos.

Substratos da indústria do processamento de batatas foram avaliados para produção de biossurfactantes. Um estudo realizado por Fox; Bala (2000) demonstrou a ameaça ao meio ambiente dos resíduos ricos em amido das indústrias do processamento de batatas. Thompson et al., (2000) utilizaram efluentes de batata para produção de um biossurfactante, o surfactin. A máxima produção ocorreu na fase estacionária de crescimento, exibindo um bom índice de emulsificação e

recuperando solos contaminados por óleos. Dubey; Juwarkar (2001) estudaram a produção de biossurfactantes em meio sintético utilizando um resíduo industrial como fonte de carbono.

2.5 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes ocupam uma posição química especial, pois podem ser aplicados em diversas áreas, como o aumento da recuperação de óleos, auxiliando na biodegradação de poluentes insolúveis em água e do material processado nas indústrias alimentícias (HOROWITZ; CURRIE, 1990; MCLNERNEY et al., 1990). As indústrias alimentícias, de cosméticos e drogas dermatológicas, muito citadas em literatura, são outras áreas de aplicação dos biossurfactantes (PELLERIN et al., 1992). Vários estudos demonstram a possibilidade de ação dos biossurfactantes (POLMAN et al., 1994). Recentemente, tem sido relatado o uso de biossurfactantes na biorremediação de áreas poluídas por hidrocarbonetos (SHEPHERD et al., 1995).

Cameotra; Makkar (1998) aplicaram biossurfactantes para a solubilização parcial do carvão, utilizando uma preparação de biossurfactante produzido por *Candida bombicola*. Mulligan et al., (2001) utilizaram surfactin, ramnolipídeos e soforolipídeos em experimentos para remoção de metais pesados de sedimentos. Algumas outras aplicações dos biossurfactantes também foram relatadas, como na indústria de papel, em indústrias têxteis, de cerâmica e no processamento de urânio (DELEU; PAQUOT, 2004).

Os biossurfactantes são amplamente utilizados em vários produtos, como em cosméticos e em indústrias de medicamentos (Tabela 1). Vários produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, incluindo repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas, pasta de dentes etc (KLECKNER; KOSARIC, 1993; MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000). Os biossurfactantes podem ser utilizados em produtos para o cuidado pessoal, pois apresentam baixa toxicidade (BROWN, 1991). Soforolipídeos são utilizados comercialmente pela Kao Co. Ltd., 1984 como umectantes em cosméticos. O produto contém 1 mol de soforolipídeos e 12 moles de propileno-glicol (YAMANE,

1987).

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

Tabela 1 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes
(BANAT et al., 2000; MULLIGAN, 2005)

Funções	Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene e cosméticos
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação do petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

2.6 VANTAGENS DOS BIOSSURFACTANTES

Muitas características dos biossurfactantes apresentam vantagens sobre os surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002):

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

- tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em

ambientes com condições mais drásticas (GARTI, 1999). Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999);

- biodegradabilidade: diferente dos surfactantes químicos os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN et al., 1993; URUM et al., 2004);

- baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998); além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e na biorremediação de ambientes poluídos (URUM et al., 2004).

Os biossurfactantes também apresentam as vantagens de: poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuir grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (DESAI; BANAT, 1997). Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (Tabela2) (REISER et al., 1989). Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não são derivados do petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes por meio de manipulações genéticas, biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Tabela 2 – Tensões superficiais de surfactantes sintéticos e do líquido metabólico de bactérias e leveduras

Surfactantes sintéticos/ Microrganismos	Tensão superficial (mN/m)	Referências
Tween 80	45,0	BEHRING et al., 2004
Lauril Sulfato de Sódio (SDS)	37,0	BEHRING et al., 2004
Brometo de n-hexadecil trimetil amônio (CTAB)	55,0	BEHRING et al., 2004
<i>Rhodococcus</i> sp.	28,5	KUYUKINA et al., 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MM1011	28,0	TAHZIBI et al., 2004
<i>Serratia</i> sp.	34,4	CUNHA et al., 2004
<i>Nocardia</i> sp.	28,0	KIM et al., 2000
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256	27,2	SEN; SWAMINATHAN, 2005
<i>Candida lipolytica</i> (UCP 0988)	26,0	RUFINO et al., 2005a
<i>C. lipolytica</i>	33,0	MULLIGAN, 2005
<i>B. pumilus</i>	27,0	MULLIGAN, 2005
<i>P. aeruginosa</i> (MEOR171)	29,0	ROCHA et al., 1992
<i>P. aeruginosa</i> (PA1)	30,0	SANTA ANNA et al., 2005
<i>Bacillus</i> sp. JF2	27,0	JENNINGS; TANNER, 2004
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)	37,0	CHEN, 2004
<i>Candida bombicola</i> (ATCC22214)	25,0	LANG, 2002
<i>P. aeruginosa</i> 47T2	32,0	LANG, 2002
<i>P. aeruginosa</i> AT10	28,0	LANG, 2002
<i>Bacillus</i> sp. LB2a	26,0	NITSCHKE et al., 2005

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, CJ, MIMS, CW, BLACKWELL, M. Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York-4th ed. 1996.

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

BANAT, IM, MAKKAR, RS, CAMEOTRA, SS. Potential Commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BEHRING, JL, LUCAS, M, MACHADO, C, BARCELLOS, IO. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495. 2004.

BENTO, FM, GAYLARDE, CC. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.38, p. 31-33. 1996.

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

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

CAMEOTRA, SS, MAKKAR, RS. Shyntesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529. 1998.

CHEN, C. Rhamnolipid biosurfactant behavior in solutions. **Journal Biomater. Sci. Polymer**, v. 15, p. 229-235. 2004.

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

COOPER, DG, MACDONALD, CR, DUFF, SJB, KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412. 1981.

COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 47, p. 173-176. 1984.

COOPER, DG, LISS, SN, LONGAY, R, ZAJIC, JE. Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 97-101. 1989.

CUNHA, C.D., ROSÁRIO, M., ROSADO, A.S., LEITE, S.G.F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 2277-2282. 2004.

DELEU, M, PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chemie**, 2004.

DESAI, JD, BANAT, IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbial Mol Rev**, v. 61, p. 47-64. 1997.

DUBEY, K, JUWAKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 17, p. 61-69. 2001.

FOX, SL, BALA, GA. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresour. Technol**, v. 75, p. 235-240. 2000.

FRANCY, DS, THOMAS, JM, RAYMOND, RL, WARD, CH. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **J.Ind.Microbiol**, v. 8, p. 237-246. 1991.

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

GARTI, N. What can offer from na emulsifier point of view: trends and progress? **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p.125-146. 1999.

HABA, E, ESPUNY, MJ, BUSQUETS, M, MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol**, v. 88, p. 379-387. 2000.

HOROWITZ, S, CURRIE, JK. Novel dispersants of silicon carbide and aluminum nitride. **J. Dispersion Sci. Technol**, v. 11, p. 637-659. 1990.

JENNINGS, EM, TANNER, RS. The effects of a *Bacillus* biosurfactant on methanogenic hexadecane degradation. **Bioremediation Journal**, v. 8, p. 79-86. 2004.

KAO CHEMICAL Co., Australian Patent 8317-555, 1984.

KIM, SH, LIM, EJ, LEE, SO, LEE, JD, LEE, TH. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L - 417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253. 2000.

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

KUYUKINA, MS, IVSHINA, IB, PHILP, JC, CHRISTOFI, N, DUNBAR, SA, RITCHKOVA, MI. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 149-156. 2001.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 12-20. 2002.

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

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

MARÇAL, M. DO CR. **Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê)**. 1991. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

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

MCLNERNEY, MJ, JAVAHERI, M, NAGLE, DP. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. **J. Ind. Microbiol**, v. 5, p. 95-102. 1990.

MERCADE, ME, MANRESA, A, ROBET, M, ESPUNY, MJ, DEANDRES, C, GUINEA, J. Olive oil Mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresour. Technol**, v. 43, p. 1-6. 1993.

MERCADE, ME, MONLEON, L, DEANDRES, C, RONDON, I, MARTINEZ, E, ESPUNY, MJ, MANRESA, A. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **J. Appl. Bacteriol**, v. 81, p. 161-168. 1996.

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

MULLIGAN, CN, GIBBS, BF. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), Biosurfactants, Production, Properties, Applications. Marcel Dekker, New York, p. 329-371. 1993.

MULLIGAN, CN, YONG, RN, GIBBS, BF. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **J. Hazard. Mater**, v. 85, p. 111-125. 2001.

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

MURIEL, JM, BRUQU, JM, OLFAS, JM, JIMENEZ-SANCHEZ, A. Production of biosurfactant by *Cladosporium resinae*. **Biotechnol. Lett**, v. 18, p. 235-240. 1996.

NITSCHKE, M, Pastore, GM. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776. 2002.

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

NITSCHKE, M, FERRAZ, C, PASTORE, GM. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol*, v.35, n.1-2, p. 81-85. 2004.

NITSCHKE, M, COSTA, SGVAO, CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: na update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600. 2005.

PANDEY, A, SOCCOL, CR, MITCHELL, DA. New developments in solod-state fermentation: l-bioprocess and products. **Process Biochem**, v. 35, p. 1153-1169. 2000.

PELLERIN, NB, STALEY, JT, REN, T, GRAFF, GL, TREADWELL, DR, AKSAY, IA. Acidic biopolymers as dispersants for ceramic processing. **Mater Res Soc Symp Proc**, v. 218, p. 123-128. 1992.

POLMAN, JK, MILLER, KS, STONER, DL, BRACKENRIDGE, CR. Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthetized surfactants. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 61, p. 11-17. 1994.

REISER, J, KOCH, AK, JENNY, K, KAPPELI, O. Advances in Applied Biotechnology Series, 1989.

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

ROCHA, C, SAN-BLASS, F, SAN-BLASS, G, VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 125-128. 1992.

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

ROSENBERG, E. Microbial surfactants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 3, p. 109-132. 1986.

ROSENBERG, E, RON, EZ. Surface active polymers from the genus *Acinetobacter*. In: Kaplan DL (ed) Biopolymers from renewable resources. Springer, Berlin Heidelberg New York. p. 281-291. 1998.

RUFINO, RD, LUNA, JM, AMORIM, AS, TAKAKI, GMC, SARUBBO, LA. Biosurfactant production by *Candida lipolytica* using an industrial residue as substrate. In: Second European Bioremediation Conference, Chania-Crete. p. 461-464. 2003.

RUFINO, RD, SARUBBO, LA, TAKAKI, GMC. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando substratos de baixo custo. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM). Recife-PE. 2005a.

SANTA ANNA, LM, SORIANO, AU, GOMES, CA, MENEZES, EP, GUTARRA, MLE, FREIRE, DG, PEREIRA JR, N. Remoção de óleo de solos impactados utilizando biotenssoativos do tipo ramnolípídeos. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM). Recife-PE. 2005.

SARUBBO, LA, MARÇAL, MCR, CAMPOS-TAKAKI, GM. Comparative study on bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* strains. **Arq. Biol. Technol**, v. 40, p. 707-720. 1997.

SARUBBO, LA, PORTO, ALF, CAMPOS-TAKAKI, GM. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 423-426. 1999.

SARUBBO, LA, MARÇAL, MCR, NEVES, MLC, SILVA, MPC, PORTO, ALF, CAMPOS-TAKAKI, GM. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, p. 59-67. 2001.

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

SHEPHERD, R., ROCKEY, J., SUTHERLAND, I.W., ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **J. Biotechnol**, v. 40, p. 207-217. 1995.

STANGHELLINI, ME, RAMUSSEN, SL, KIM, DH, RORABAUGH, PA. Efficacy of non ionic surfactants in control of zoosporic spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. **Plant Dis**, v. 80, p. 422-428. 1996.

STANGHELLINI, ME, MILLER, RM. Biosurfactants. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Dis**, v. 81, p. 4-12. 1997.

TAHZIBI, A, KAMAL, F, ASSADI, MM. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v. 8, p. 25-31. 2004.

THOMPSON, DN, FOX, SL, BALA, GA. Biosurfactants from potato process effluents. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 84, p. 917-930. 2000.

TULEVA, BK, IVANOV, GR, CHRISTOVA, NE. Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 57, p. 356 - 360. 2002.

URUM, K, PEKDEMIR, T, COPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 456-464. 2004.

URUM, K, PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v. 57, p. 1139-1150. 2004.

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

VANCE-HARROP, MH, GUSMÃO, NB, CAMPOS-TAKAKI, GM. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123. 2003.

VANCE-HARROP, M.H. **Potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactantes, nos processos de remoção e bioissorção do pireno (derivado do petróleo)**. 2004. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

VOLLBRECHT, E, RAU, U, LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. **Fett/Lipid**, v. 101, p. 389-394. 1999.

YAMANE, T. Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 64, p. 1657-1662. 1987.

ARTIGO I

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando resíduo da refinaria de óleo vegetal e extrato de levedura como substratos

Manuscrito a ser submetido para publicação no:
Biotechnology Progress

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando resíduo da refinaria de óleo vegetal e extrato de levedura como substratos

Raquel D. Rufino^{1,2}, Leonie A. Sarubbo^{2,3}, Edson P. Carrazzoni³, Benício B. Neto⁴, Galba M. Campos-Takaki^{2,3*}

¹Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil;

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco;

³Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, n.42, Bl J, Térreo, Boa Vista Cep: 50050-590, Recife - Pernambuco, Brasil.

⁴Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife - Pernambuco, Brasil

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

Fax Number: +55-81-321194043

Abstract

The prerequisites for a commercial fermentation process of biosurfactants include the use of low cost substrates. This work describes the experimental results carried out on the fermentation of *Candida lipolytica*, which produced a new biosurfactant when grown on a vegetable oil refinery residue as substrate with a yield of 4.5 g l⁻¹. The cell-free culture broth containing the examined biosurfactant caused the formation of stable emulsions with hydrophobic of natural compounds. Emulsification properties of the biosurfactant were not affected by salinity, indicating a potential value in processes for the oil industries. The isolated biosurfactant reduced the surface tension of water from 71mN m⁻¹ to 32mN m⁻¹. Preliminary chemical characterizations showed that the biosurfactant is constituted by protein (50%), lipid (20%) and carbohydrate (8%).

Keywords: Bioemulsifier; Biosurfactant; *Candida lipolytica*; Hydrophobic substrate

INTRODUÇÃO

A necessidade industrial por surfactantes está em constante crescimento¹. A importância comercial dos surfactantes na área ambiental, é evidenciada no grande número de aplicações industriais^{2,3}. A utilização de biossurfactantes no meio ambiente está relacionada principalmente a biorremediação de hidrocarbonetos derivados do petróleo em ambientes marinhos e em solos^{4,5}. Nas indústrias de óleos, são utilizados na recuperação do petróleo, facilitando o transporte do óleo cru⁶. Os biossurfactantes têm atraído grande atenção por apresentarem algumas vantagens frente aos surfactantes químicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica^{7,8}. Algumas estratégias estão sendo desenvolvidas para a produção comercial de biossurfactantes, para que eles possam competir com os surfactantes químicos⁹. Por exemplo, a utilização de substratos de baixo custo pode permitir uma redução de mais de 50% dos custos finais de produção de biossurfactantes¹⁰.

O mundo produz em torno de 2,5 a 3 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, e em torno de 75% dessa produção é derivada de plantas¹¹. Muitos óleos e gorduras são utilizados na indústria de alimentos, gerando grande quantidade de resíduos, cuja disposição é um problema ambiental¹⁰. No nordeste do Brasil resíduos gordurosos são produzidos em grande quantidade (1890 ton/ano) a partir de refinarias de óleos vegetais e podem ser utilizados como fontes de carbono com grande potencial comercial¹².

Várias leveduras são conhecidas por produzirem emulsificantes extracelulares, quando cultivadas em substratos imiscíveis em água, como alcanos e óleos. Dentre as leveduras, espécies de *Candida* apresentam um grande potencial em relação à produção de biossurfactantes, uma vez que são capazes de utilizar vários hidrocarbonetos como fonte de carbono¹³. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização do resíduo de refinaria de óleo vegetal como substrato para produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*.

MÉTODOS

Microrganismo

Candida lipolytica UCP 0988 obtida da coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, foi mantida a 5°C em meio Yeast Mold Agar (YMA) contendo: extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1% e ágar 2%. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento do inóculo, Yeast Mold Broth (YMB).

Condições de cultivo

A cultura foi crescida em meio contendo NH_4NO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%, extrato de levedura 0,1% e 2,5% de resíduo industrial (Tabela 1) como substrato. O pH do meio de cultura líquido foi ajustado para 5,7 com uma solução de NaOH (1M) ou de HCl (1M).

Candida lipolytica foi crescida em meio YMA a 27°C por 24 horas; então, a cultura foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do meio líquido Yeast Mold Broth (YMB) que foram incubados durante 24 horas a 27°C em shaker rotatório (Nova Ética – Mod. 430) a 150 rpm. A produção de biossurfactante foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 1000 ml, contendo 300 ml de meio mineral suplementado com 2,5% de resíduo industrial e 0,1% de extrato de levedura. Foi inoculado com 10^4 células/ml incubados em shaker rotatório a 200 rpm durante 144 horas a 27°C. O pH do meio não foi ajustado durante o cultivo. Estas condições de produção foram previamente otimizadas por Rufino et al., (2003)¹⁴. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para determinação de: biomassa, pH por potenciometria (perpHect LogRmeter – Mod. 310), índice de emulsificação e tensão superficial.

A determinação da biomassa foi realizada a partir de 50mL do líquido metabólico, centrifugado a 2000 x g (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R) durante 20 minutos, sendo a fase superior descartada e o “pellet” celular lavado com água gelada e seco em estufa (Mod. Ma 033) a 105°C por 24 horas, em

frascos de penicilina previamente pesados. Após esse período, a biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica (Mod. AB104/METTLER TOLEDO).

Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987)¹⁵ onde 2 ml de hidrocarbonetos foram adicionados a 2 ml do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação, em tubos graduados e agitados em vórtex durante 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas, e o índice de emulsificação (E) foi calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor então multiplicado por 100. O índice de emulsificação também foi determinado em diferentes tempos (1–7 dias), temperatura (5°, 28° e 100°) e concentrações de NaCl (2,0; 5,0 e 10,0%).

Isolamento e caracterização do biossurfactante produzido

O líquido metabólico foi centrifugado (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R), liofilizado (Liofilizador Mod. LABCONCO VIDY – FREEZONE 4.5), e o biossurfactante extraído utilizando o seguinte sistema: clorofórmio/líquido metabólico (1:1 v/v). Após essa etapa a fase aquosa foi liofilizada e o rendimento de biossurfactante determinado por gravimetria.

A determinação das proteínas do biossurfactante foi realizada utilizando o kit de proteínas totais Labtest Diagnóstica S.A. Brasil. Os açúcares totais foram determinados conforme a metodologia descrita por Dubois et al., (1956)¹⁶. A quantidade de lipídeos presente no biossurfactante foi determinada utilizando clorofórmio:metanol em diferentes proporções (1:1 e 1:2 v/v). O extrato orgânico foi evaporado e o conteúdo de lipídeos determinados por gravimetria¹⁷.

Tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A tensão superficial foi determinada utilizando o anel de DuNouy em Tensiômetro modelo Sigma 70 (KSV Instruments LTD, Finland) a temperatura ambiente. A CMC foi determinada automaticamente pela medida da tensão superficial da água destilada com crescentes concentrações de biossurfactante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca pela produção de biossurfactantes por leveduras depende da identificação de resíduos de baixo custo. O objetivo em produzir surfactantes comercialmente depende de uma ótima qualidade e uma grande quantidade. Os resíduos industriais apresentam um grande potencial para a produção de biossurfactantes com um custo reduzido, já que podem ser utilizados como fonte de carbono pelos microrganismos. Em muitos processos de produção de biossurfactantes a fonte de carbono representa cerca de 50% do custo total da produção¹⁸.

Candida lipolytica foi cultivada em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extrato de levedura como substratos durante 144 horas (Figura 1). A máxima produção de biomassa ocorreu após as 60 horas de crescimento. A redução da tensão superficial foi observada durante a fase exponencial de crescimento, obtendo valores mínimos após 24 horas de cultivo, indicando excelentes propriedades superficiais do biossurfactante produzido. O pH permanece praticamente inalterado durante o crescimento. Considerando que a acidez do meio é um parâmetro correlacionado com a eficiência na síntese de biossurfactantes, baseados em resultados experimentais anteriores, Bednarski et al., (2004)¹⁹ estabeleceram um meio de crescimento líquido com pH de 5,5, no qual obtiveram consideráveis resultados em termos da síntese de glicolipídeos por *C. apicola* utilizando resíduo industrial como substrato.

Em adição à tensão superficial e interfacial, à estabilização de emulsões de óleo e água é comumente utilizada como indicador de atividade superficial. A atividade de emulsificação do biossurfactante produzido foi determinada para vários substratos imiscíveis em água (Figura 2). Altos valores de emulsão foram obtidos para o óleo motor (100%). Já o óleo diesel e o hexano não foram efetivamente emulsificados. Estes resultados indicam que o biossurfactante produzido apresenta especificidade de emulsificação para o óleo motor e para o n-hexadecano (Figura 2). Resultados similares foram obtidos para *Rhodococcus* cultivada em hidrocarbonetos

(ABU-RUWAIDA et al., 1991)²⁰. Os resultados obtidos confirmam que a atividade de emulsificação depende da afinidade do biossurfactante produzido pelo hidrocarboneto testado.

A Figura 3 demonstra a influência do tempo na capacidade emulsificante do biossurfactante produzido pela *C. lipolytica*. Muitas das emulsões formadas, utilizando diferentes hidrocarbonetos, demonstraram estabilidade por um período superior a sete dias.

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais: tolerância à temperatura, pH e força iônica²⁰⁻²². A Figura 4 mostra a resistência do biossurfactante frente a diferentes temperaturas (5°, 28° e 100°C), demonstrando que sua estabilidade não foi alterada quando submetido a 5°C e a 28°C, embora a 100°C as atividades de emulsificação não foram significativas, estes resultados são semelhantes aos resultados observados por Abu-Ruwaida et al., (1991)²⁰.

Além dos testes de temperatura, a estabilidade do surfactante frente a diferentes concentrações de NaCl (2,5, 5 e 10%) também foi avaliada. Como mostra a Figura 5, observou-se que o surfactante emulsificou bem os substratos testados independentes da concentração de NaCl à qual foi submetido. Apenas o hexano não foi emulsificado em todas as concentrações do sal adicionadas ao líquido metabólico. Estes resultados estão de acordo com achados da literatura que relatam a estabilidade dos biossurfactantes a concentrações de 10% de NaCl, enquanto que concentrações salinas de 2% e 3% são suficientes para inativar surfactantes convencionais²³.

A extração do biossurfactante em clorofórmio permitiu o isolamento do biopolímero. Este se apresentou como um precipitado branco solúvel em água. Os resultados indicaram uma recuperação de 111% da atividade de emulsificação para o produto isolado, sendo este valor bastante favorável, uma vez que o máximo de recuperação da atividade em cultivos de *C. lipolytica* utilizando óleos vegetais como

substratos foi de 96% em meio de óleo de coco, conforme descrito por Sarubbo et al. (1999)²⁴.

O biossurfactante isolado apresentou 50% de proteínas, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos em sua constituição. Diferentemente, o liposan produzido por *C. lipolytica* utilizando hexadecano como substrato é composto por 83% de carboidratos e 17% de proteínas²⁵. Outro biopolímero produzido em laboratório por *C. lipolytica* utilizando glicose como substrato, apresentou 47% de proteínas, 45% de carboidratos e 5% de lipídeos¹³ e o bioemulsificante obtido utilizando óleo de babaçu como substrato, apresentou 60% de carboidratos, 23% de proteínas e 11% de lipídeos, demonstrando que o mesmo microrganismo pode produzir diferentes biossurfactantes dependendo do substrato utilizado²⁴. Mais recentemente, o biossurfactante produzido por *Curvularia lunata* utilizando resíduos insolúveis como substrato, apresentou 25% de proteínas e 48% de polissacarídeos²⁶.

Outra importante propriedade dos biossurfactantes potentes é a habilidade de atuarem na redução da tensão superficial de soluções aquosas²⁷. A Figura 6 mostra a CMC do biossurfactante produzido que foi de aproximadamente 1%, e a tensão superficial da água apresentou uma redução de 71 mN/m para 32 mN/m.

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o biossurfactante produzido pela *C. lipolytica*, apresentou estabilidade frente a diferentes tempos, temperaturas e concentrações de sal, podendo ser utilizado no controle da poluição ambiental causada por compostos oleosos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo FINEP/CTPETRO e CNPq .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Batista SB, Mounteer AH, Amorim FR and Tótola MR, Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*. In Press, corrected Proof, Available online (2005).
- (2) Desai JD and Desai A, In: N. Kosaric (Ed.), Biosurfactants. Marcel Dekker Inc., New York, 65-86 (1992).
- (3) Ron EZ and Rosenberg E, Natural roles of biosurfactants. *Environm. Microbiol* **3**: 229-236 (2001).
- (4) Foght JM, Gutnick DL and Westlake DWS, Effect of emulsion on biodegradation of crude oil by pure and mixed cultures. *Appl. Environm. Microbiol* **55**: 36-42 (1989).
- (5) Francy DS, Thomas JM, Raymand RL and Ward CH, Emulsification of hydrocarbons by surface bacteria. *J. Industrial Microbiol* **8**: 237-246 (1991).
- (6) Ghurye GL, Vipulanandan C and Willson RC, A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng* **44**: 661-666 (1994).
- (7) Zhou QH and Kosaric N, Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *Journal American Oil Chemistry Society* **72**: 67-71 (1995).
- (8) Costa SGVAO, Nitschke M, Haddad R, Erbelin MN and Contiero J, Production *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry* **21**: 1593-1600 (2005).

- (9) Nitschke M and Pastore GM, Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Quimica Nova* **25**: 772-776 (2002).
- (10) Makkar RS and Cameotra SS, An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **58**: 428-434 (2002).
- (11) Haba E, Espuny MJ, Busquets M and Manresa A, Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol* **88**: 379-387 (2000).
- (12) Miranda OA, Salgueiro AA, Pimentel MCB, Lima Filho JL, Melo EHM and Durán N, Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technol* **69**: 145-147 (1999).
- (13) Sarubbo LA, Marçal MC, Neves MLC, Silva MPC, Porto ALF and Campos-Takaki GM, Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol* **95**: 59-67 (2001).
- (14) Rufino RD, Luna JM, Amorim AS, Campos-Takaki GM and Sarubbo LA, Biosurfactant production by *Candida lipolytica* using an industrial residue as substrate. *2nd European Bioremediation Conference* - Chania, Crete, Greece (2003).
- (15) Cooper DG and Goldenberg BG, Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environm. Microbiol* **53**: 224-229 (1987).
- (16) Dubois M, Gilles KA and Hamilton JK, Colorimetric method for determination of sugar and related substances – Analytical Chemistry. *Easton* **28**: 350-356 (1956).

- (17) Manocha MS, San-Blas G and Centeno S, Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. *J. General Microbiol* **117**: 147-154 (1980).
- (18) Arbige MV and Pitcher WM, Industrial enzymology: a look towards the future. *Tibtech* **7**: 331-000 (1989).
- (19) Bednarski W, Adamczak M, Tomasik J and Plaszczyk M, Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology* **95**: 15-18 (2004).
- (20) Abu-Ruwaida AS, Banat IM, Haditirto S, Salem A and Kadri M, Isolation of biosurfactant-producing bacteria - Product characterization, and evaluation. *Acta Biotechnologica* **2**: 315-324 (1991).
- (21) Cirigliano MC and Carman GM, Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environm. Microbiol* **48**: 747-750 (1984).
- (22) Miller RM and Zhang Y, Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl. Environm. Microbiol* **58**: 3276-3282 (1992).
- (23) Desai JD and Banat IM, Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **61**: 47-64 (1997).
- (24) Sarubbo LA, Porto ALF and Campos-Takaki GM, The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology* **45**: 423-426 (1999).

(25) Cirigliano MC and Carman GM, Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 846-850 (1985).

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

(27) Cooper DG and Zajic JE, Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol* **26**: 229-253 (1980).

Figura 1

Crescimento, pH e redução da tensão superficial durante o crescimento de *Candida lipolytica* em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extrato de levedura.

Figura 2

Emulsificação de hidrocarbonetos pelo biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura.

Figura 3

Influência do tempo na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura.

Figura 4

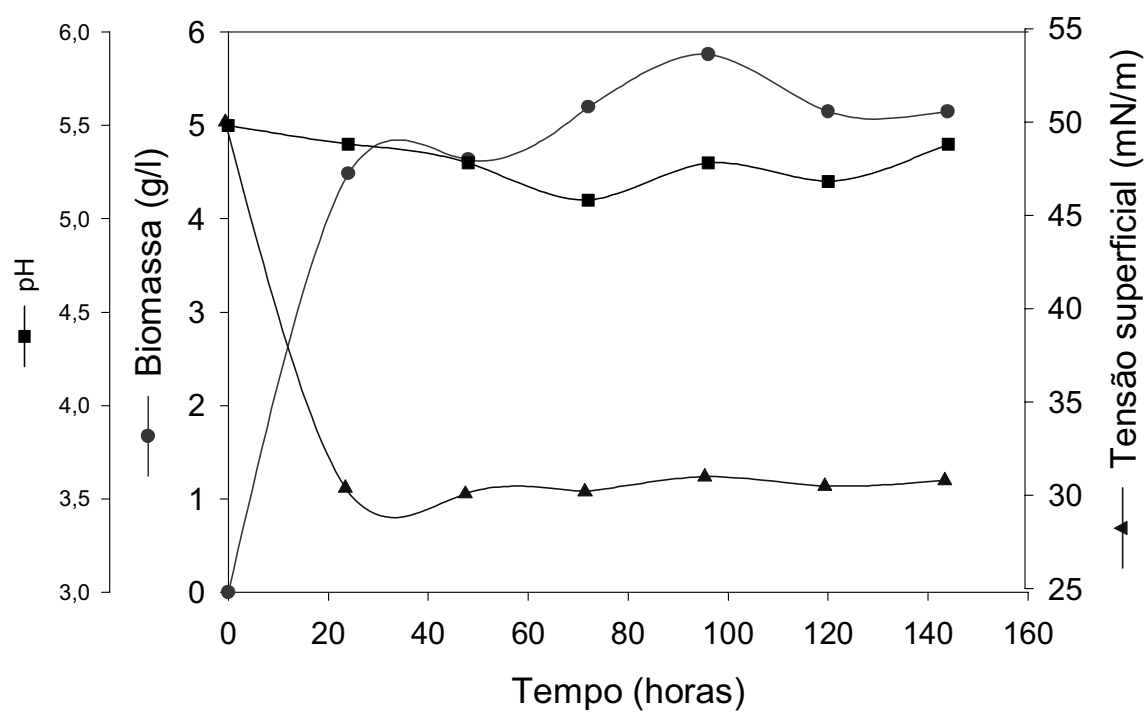
Influência da temperatura na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura.

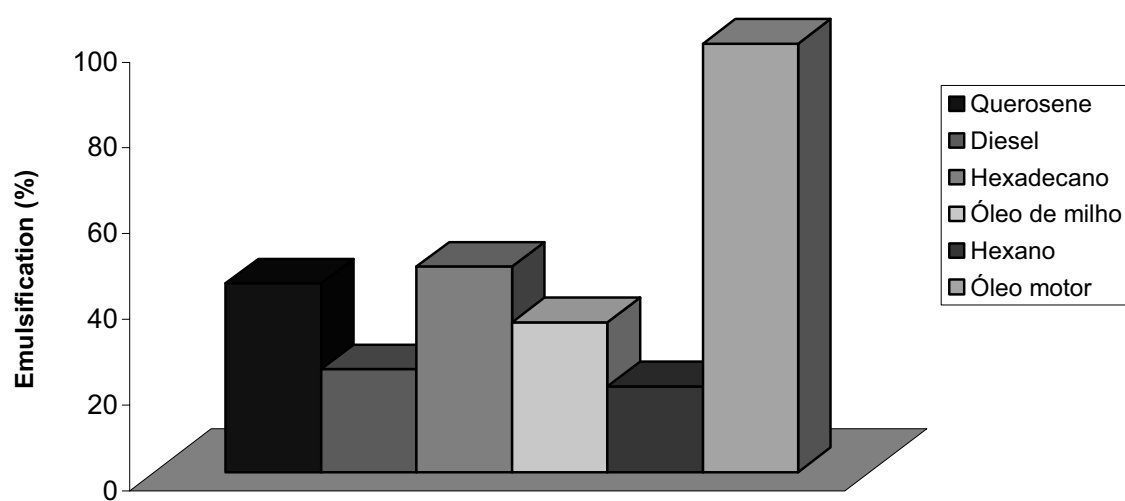
Figura 5

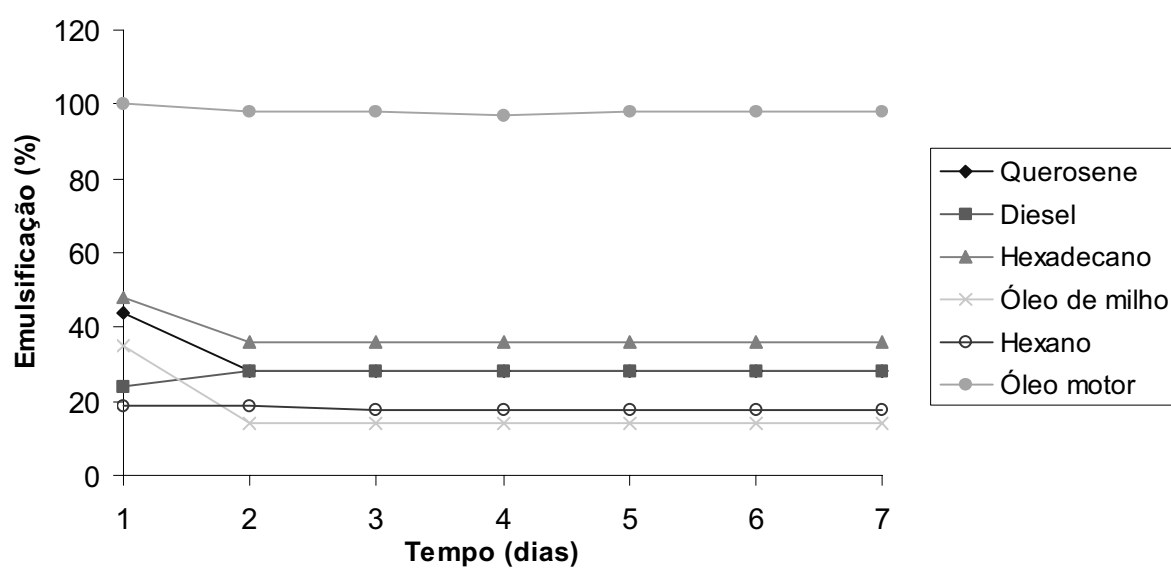
Influência de diferentes concentrações de NaCl na capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura.

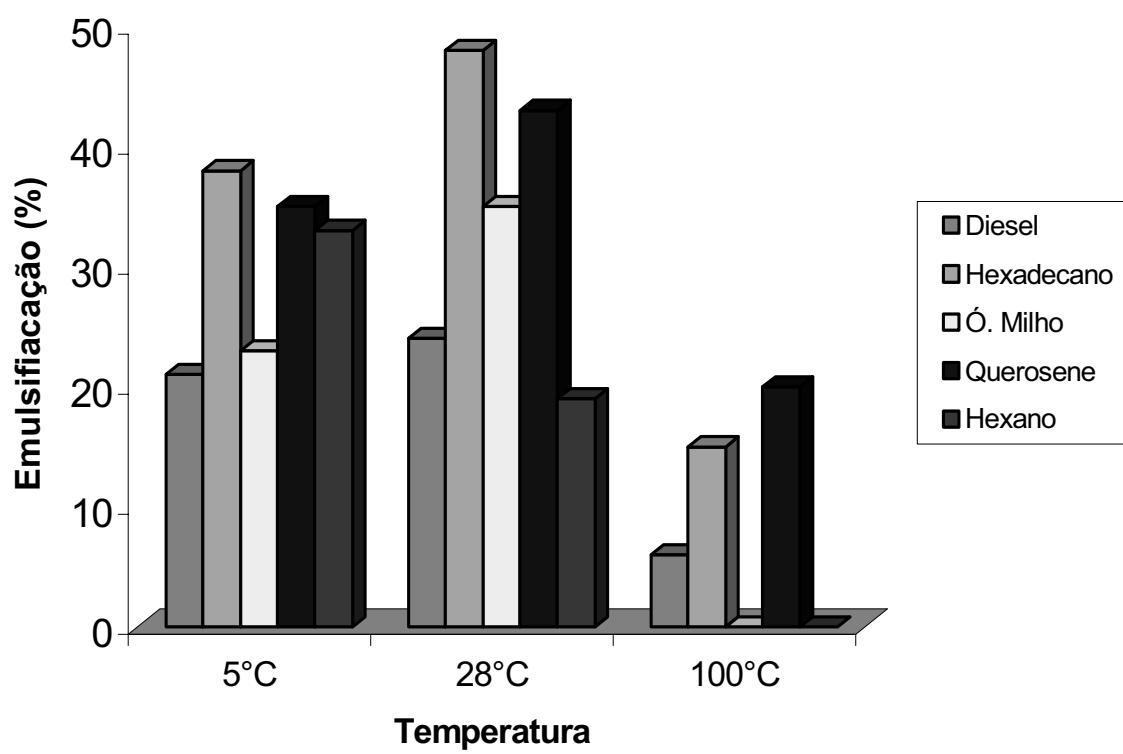
Figura 6

Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* em meio mineral contendo 2,5% de resíduo industrial da refinaria de óleo vegetal e 0,1% de extato de levedura.

**Figura 1**

**Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**

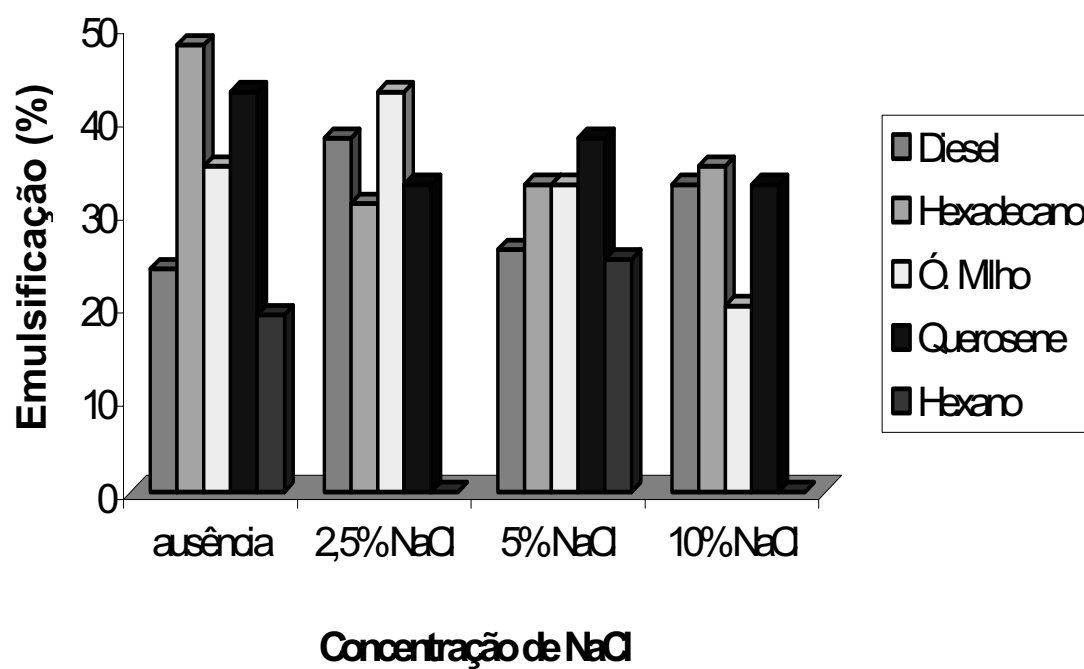


Figura 5

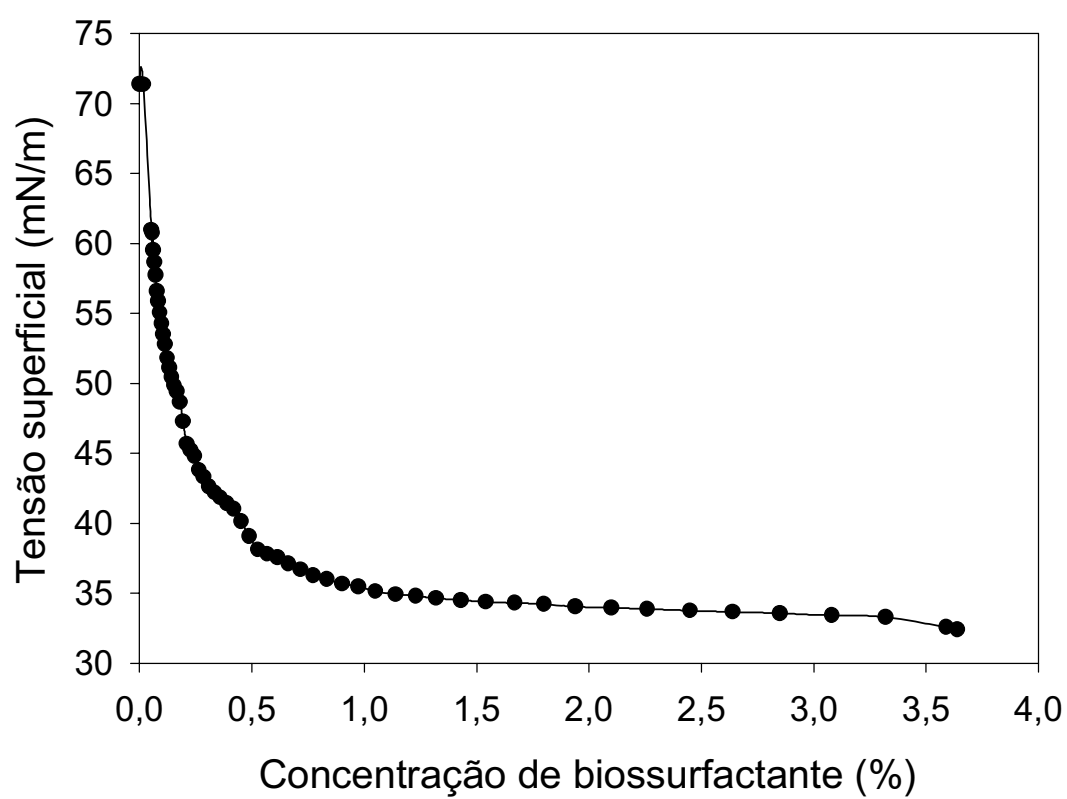
**Figura 6**

Tabela 1

Composição do resíduo da refinaria de óleo vegetal (Miranda et al., 1999)

Composição	% ^a
Material graxo	60,000
Carboidratos	35,000
Sódio	2,700
Magnésio	0,080
Potássio	0,063
Zinco	0,004
Ferro	Não detectado

^apeso seco

ARTIGO II

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando ácido glutâmico e resíduo da refinaria de óleo vegetal como substratos

Manuscrito a ser submetido para publicação no:
Bioresource Technology

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando ácido glutâmico e resíduo da refinaria de óleo vegetal como substratos

Rufino, R.D.^{1,2}, Sarubbo, L.A.^{2,3}; Barros-Neto, B.⁴; Campos-Takaki, G.M.^{2,3*}

¹Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil;

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco;

³Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife - Pernambuco, Brasil;

⁴Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife - Pernambuco, Brasil

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

Fax Number: +55-81-321194043

RESUMO

Surfactantes são moléculas anfipáticas que se particionam nas interfaces com diferentes graus de polaridade. A composição do meio de cultura para a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* foi estudada utilizando planejamentos fatoriais, combinando as variáveis resíduo industrial, extrato de levedura e ácido glutâmico. Considerando o elevado custo de extrato de levedura, e os resultados obtidos após a realização do primeiro planejamento, outros planejamentos foram realizados, excluindo o extrato de levedura. Os resultados obtidos demonstraram que os aumentos das concentrações do resíduo e do ácido glutâmico, atuaram na redução da tensão superficial do meio de cultivo de 50mN/m para 26mN/m. O biossurfactante produzido formou emulsões estáveis de 4,5 Unidades de Atividade de Emulsificação (U.A.E.) em todos os hidrocarbonetos testados após 40 horas de cultivo. O biopolímero produzido permaneceu estável frente a diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl. Considerando os resultados obtidos, a produção de biossurfactante por *C. lipolytica* em meio de baixo custo, representa uma alternativa para a produção de um biopolímero estável, possibilitando aplicações futuras no controle da poluição causada por petróleo e derivados.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*; Meio de baixo custo; Planejamento fatorial

ABSTRACT

The production of biosurfactants by *Candida lipolytica* UCP0988 was carried out by the use of sequential factorial designs. The first factorial design was established by using three variables: industrial residue, yeast extract and glutamic acid. According to the results obtained, others designs were developed excluding the yeast extract from the medium of cultivation. The results obtained showed that the best concentrations of the residue and of the glutamic acid were 6% and 1%, respectively, favoring the reduction of the surface tension of the medium to 26 mN m⁻¹. The kinetics of biosurfactant production in the optimized medium was evaluated during 72 hours at 150 rpm and 28 °C. The biosurfactant formed stable emulsions of 4.5 U.A.E during the stationary growth phase, while the surface tension of the cell-free broth showed only little changes when submitted under different temperatures, pH's and NaCl concentrations. The biosurfactant produced by *C. lipolytica* cultivated in low-cost medium represents an alternative of a stable biopolymer, permitting future applications in the control of environmental pollution caused by petroleum and derivates and in the industries of the country.

Keywords: *Candida lipolytica*; Low-cost medium; Factorial design

INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos, amplamente utilizados em diversos setores industriais, como na indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo, ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, em produtos de higiene e cosméticos, na indústria de papel, têxtil e de cerâmica (Makkar e Cameotra 1998).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, esses compostos tendem a se distribuir nas interfaces, com diferentes graus de polaridade (água-óleo ou ar-água), formando um filme molecular, reduzindo, desse modo, a tensão interfacial e superficial. Estas propriedades dos surfactantes os tornam adequados para várias aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (Mayer e Soberon-Chaves 2000; Nitschke e Pastore 2002).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser aplicados em uma variedade de processos industriais; entretanto, ainda não são amplamente utilizados, devido ao seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto (Ron e Rosenberg 2001; Makkar e Cameotra 2002).

Uma possível solução para a redução do custo de produção de biossurfactantes seria o uso de subprodutos industriais, como o resíduo da refinaria de óleos vegetais, como substrato. Adicionalmente, a manipulação da composição do meio de cultura, também pode permitir aumento da produtividade (Gallert e Winter 2002; Tuleva et al. 2002; Rufino et al. 2005a).

Neste contexto, a produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica*, a partir de resíduos industriais, representa uma alternativa para a produção de biopolímeros com atividade de emulsificação, possibilitando aplicações futuras no controle da poluição, causada por petróleo e derivados, em ecossistemas terrestres e aquáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a *Candida lipolytica* - Harrison (Diddens e Lodder 1958), (UCP 0988), pertencente ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, mantido em meio Yeast Mold Agar (YMA) a 5 °C.

Substrato

O substrato utilizado foi o resíduo industrial de refinaria de óleo de soja, constituído por material gorduroso 60%, carboidrato 35%, sódio 2,7%, magnésio 0,08%, potássio 0,063%, zinco 0,004 % (Miranda et al. 1999).

Meios de cultura

Meio de manutenção

O meio de manutenção utilizado foi o Yeast Mold Agar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, D - glicose 1%, peptona 0,5%, ágar 2%, água destilada q.s.p. 100 mL. Os componentes foram solubilizados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento do inóculo, Yeast Mold Broth (YMB).

Meio base de produção

Para a produção do biossurfactante foi utilizado o seguinte meio: NH_4NO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%. Os componentes químicos foram dissolvidos e as fontes resíduo industrial, extrato de levedura e ácido glutâmico, adicionadas ao meio de acordo com os planejamentos fatoriais descritos nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos, sendo o pH final ajustado para 5,5 (Potenciômetro perpHect Logmeter – mod. 310).

Otimização do meio de produção utilizando planejamentos fatoriais seqüenciais

O inóculo foi padronizado transferindo-se a amostra de *C. lipolytica* para tubos de ensaio contendo o meio YMA, crescida por 72 horas a 28 °C. Em seguida, a cultura foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio YMB e foram incubados sob agitação orbital de 150 rpm a 28 °C em shaker rotatório (Mod. Nova Ética 430), durante 24 horas. As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio base de produção e incubados com 5 % de uma suspensão celular de 10^8 células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 72 horas, à temperatura de 28 °C.

Cinco planejamentos fatoriais completos foram realizados. O primeiro de 2^3 com 8 ensaios e 4 repetições no ponto central, foi realizado com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes: resíduo de refinaria, extrato de levedura e ácido glutâmico sobre a variável resposta tensão superficial. Os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 1. O segundo planejamento fatorial de 2^2 , foi realizado com 4 ensaios e 3 repetições no ponto central. Os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 2. O terceiro planejamento fatorial de 2^2 com 4 ensaios e 2 repetições no ponto central, foi realizado com o objetivo de otimizar o meio de produção do biossurfactante. Os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 3. O quarto planejamento fatorial foi realizado com 4 ensaios e 2 repetições no ponto central. Os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 4. O quinto planejamento fatorial de foi realizado com 4 ensaios e 2 repetições no ponto central. Os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 5.

Alíquotas foram coletadas ao longo do cultivo para determinação da biomassa; da atividade de emulsificação e da tensão superficial; e do pH por potenciometria

(Potenciômetro perPHect LogRmeter – Mod. 310) (Cirigliano e Carman, 1984; Kuyukina et al., 2001).

A determinação da biomassa foi realizada a partir de 50mL do líquido metabólico, centrifugado a 2000 x g (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R) durante 20 minutos, sendo a fase superior descartada e o “pellet” celular lavado com água gelada e seco em estufa a 105°C por 24 horas, em frascos de penicilina previamente pesados. Após esse período, a biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica (Mod. AB104/METTLERTOLEDO) (García-Ochoa e Casas 1999).

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

A velocidade específica de crescimento ($\mu_{esp.}$) e o tempo de geração (T_G) foram determinados segundo a fórmula descrita por Pirt (1975).

Para a velocidade específica de crescimento foi utilizada a equação:

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

Onde: X = biomassa final

X_0 = biomassa inicial

T = tempo final

T_0 = tempo inicial

O tempo de geração (T_G) foi determinado pela fórmula:

$$T_G = \ln 2 / \mu_{esp}$$

Determinação do índice de emulsificação

Para a determinação do índice de emulsificação, as amostras retiradas ao longo da fermentação foram centrifugadas a 5000 x g durante 15 minutos (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R), e em seguida, analisadas

conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987) onde 2 ml de hidrocarbonetos foram adicionados a 2 ml do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação, em tubos graduados e agitados em vórtex durante 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas, e o índice de emulsificação (E) foi calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor então multiplicado por 100.

Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras retiradas ao longo da fermentação foram centrifugadas a 5000 x g durante 15 minutos, e em seguida, analisadas conforme descrito por Cirigliano e Carman (1984): amostras de 2 mL foram colocadas em tubo de ensaio (15 x 125 mm), diluídas com uma solução de tampão acetato 0,1M (pH 3,0) até um volume final de 4 mL, sendo adicionado 1 mL de um dos diferentes substratos: n-hexadecano, óleo de milho, óleo de algodão e óleo de canola. Em seguida, o tubo foi agitado por 2 minutos a 25 °C em vórtex. A emulsão obtida foi deixada em repouso por 10 minutos e em seguida determinada a absorbância a 540 nm, sendo o meio mineral utilizado como branco. A Unidade de Atividade de Emulsificação (U.A.E) foi definida como a quantidade de emulsão produzida.

Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi determinada de acordo com Kuyukina et al. (2001), utilizando um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) utilizando-se o anel de DU NUOY.

Estabilidade do biossurfactante

Os efeitos de diferentes temperaturas (0, 5, 70, 100 e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10%) e de diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12) foram avaliados no líquido metabólico livre de células, para determinação

da estabilidade da atividade surfactante, através de medidas da tensão superficial (Abu-Ruwaida et al. 1991; Cameotra e Makkar 1998; Kim et al. 2000).

Análise estatística dos resultados

Todos os dados obtidos na realização dos planejamentos fatoriais foram analisados utilizando o programa Statistica versão 6.0 da Statsoft, USA. A significância dos resultados foi estabelecida para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura para obtenção de altos rendimentos de surfactantes (Davila et al., 1992; Zhou e Kosaric, 1993, 1995; Rufino et al., 2005b).

A maximização da produção de metabólitos de interesse industrial a partir de processos fermentativos, como os biossurfactantes, entretanto, requer a padronização do meio e das condições de cultivo (Duff et al., 1973; Zhou e Kosaric, 1993; Sarubbo et al., 2006). Portanto, o emprego da modelagem estatística consiste em uma importante ferramenta que pode ser usada para explicar não só a influência mais relevante, como também, a interação entre as influências dos parâmetros fermentativos envolvidos no desempenho de um determinado processo (Myers e Montgomery, 2002). E ainda, segundo Davila et al., (1992), consiste num modo eficiente de gerar informação a partir de poucos ensaios experimentais, reduzindo, conseqüentemente, os custos e o tempo necessários para o desenvolvimento de processos experimentais. Neste sentido, planejamentos fatoriais seqüenciais foram utilizados como ferramenta estatística para realizar o processo de otimização da produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP0988, utilizando resíduo de refinaria de óleo vegetal de soja, e ácido glutâmico, na formulação do meio de cultura.

Otimização da produção do biossurfactante

A redução da tensão superficial é utilizada como um critério primário para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade em reduzir a tensão superficial (Youssef, 2004; Shepherd et al., 1995).

Neste sentido, os ensaios realizados para a produção do agente surfactante por *C. lipolytica* foram avaliados com o auxílio de um planejamento fatorial completo de 2^3 , com 4 repetições no ponto central, com a finalidade de analisar os principais efeitos e interações das variáveis: concentração do resíduo, concentração do ácido glutâmico e concentração do extrato de levedura, sobre a variável resposta tensão superficial.

De acordo com o diagrama de Pareto de efeitos padronizados (Figura 1), para um nível de 95% de confiança, pode-se observar que entre as variáveis independentes analisadas, a única que apresentou efeito significativo sobre a variável resposta tensão superficial, foi a concentração do resíduo industrial. De acordo com os resultados obtidos após 72 horas de cultivo, observou-se uma significativa redução na tensão superficial inicial do meio de 50 mN/m para 25,29 mN/m no ensaio 6 do primeiro planejamento fatorial (Tabela 1).

Os resultados obtidos foram bastante promissores, considerando que planejamentos fatoriais realizados por Cunha et al., (2004) para a confirmação de resultados preliminares obtidos por um biossurfactante produzido por *Serratia* sp. SVGG16, utilizando gasolina como substrato, a tensão superficial inicial do meio de cultivo de 67,8 mN/m foi reduzida para 34,4 mN/m, após 96 horas de cultivo. Para Mulligan (2005) o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* atuou na redução da tensão superficial do meio de cultivo para 27mN/m; enquanto que, Sen e Swaminathan (2005) demonstraram que surfactin produzido por *B. subtilis* (DSM3256) reduziu a tensão superficial do meio de cultivo para 27,2 mN/m.

Em adição à tensão superficial e interfacial, a estabilidade de emulsões óleo/água é muito utilizada como um indicador de atividade superficial, embora a

habilidade de uma molécula em formar uma emulsão estável nem sempre está associada à redução da tensão superficial (Nitschke et al., 2004; Youssef et al., 2004). A combinação entre dois líquidos imiscíveis (óleos), resulta na formação de emulsões. Quando um líquido é disperso em outro, as pequenas gotas formadas promovem uma grande quantidade de área interfacial e superficial. Quando se trata de dois líquidos puros, as gotas coalescem rapidamente, separando-se em duas fases, minimizando, assim, a área interfacial. Na presença de surfactantes, as emulsões formadas podem permanecer estáveis, através da redução da tensão interfacial e da redução do grau de coalescência. Assim, Urum e Pekdemir (2004) indicam que a estabilidade de uma emulsão está relacionada ao comportamento do equilíbrio da fase óleo/água/surfactante formada pela ação deste último.

O índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células foi determinado para diferentes substratos, obtendo-se 79% de emulsificação com o óleo de motor, embora o óleo de milho e o n-hexadecano não tenham sido efetivamente emulsificados. Brown e colaboradores (1985) obtiveram resultados semelhantes com o índice de emulsificação do óleo de motor e o óleo de milho, com valores de 78% e 70%, respectivamente, usando líquido metabólico produzido por uma bactéria aeróbia não identificada, denominada de isolado 1165. Estudos demonstraram que a atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado (Thanomsub et al., 2004; Urum e Pekdemir, 2004). É importante ressaltar que o biossurfactante produzido nas condições estabelecidas nesse trabalho demonstra aplicabilidade como agente surfactante, além de poder atuar também como agente emulsificante.

Considerando os resultados obtidos no Diagrama de Pareto, demonstrando que o extrato de levedura não atuou na redução da tensão superficial, planejamentos fatoriais seqüenciais foram desenvolvidos utilizando apenas o resíduo industrial e o ácido glutâmico, como variáveis do processo, com a finalidade de se obter um meio de produção de baixo custo.

A Figura 2 mostra a superfície de resposta de um modelo quadrático ajustado aos valores dos planejamentos finais (3, 4 e 5). O gráfico da superfície de resposta

demonstra a otimização seqüencial do meio de produção apresentando uma pequena curvatura em virtude de uma função quadrática ajustada aos resultados obtidos. Pode-se observar ainda que a região com maior concentração de resíduo (6%) e menor concentração de ácido glutâmico (1%) foi a que apresentou a menor tensão superficial de 25,29 mN/m. As superfícies dos primeiros planejamentos não foram apresentadas, pois essa região ainda não apresentava-se ajustada às melhores concentrações de ácido glutâmico e do resíduo industrial, o que ocorreu após o terceiro planejamento. Os círculos localizados na superfície apresentam os resultados das tensões superficiais determinadas em duplicata para cada condição dos planejamentos.

Cinética de crescimento e de produção do biossurfactante por *Candida lipolytica*

A Figura 3 ilustra a cinética de crescimento da *C. lipolytica* UCP0988, pH e tensão superficial do líquido metabólico obtido em condição otimizada (meio contendo 6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico). Observou-se que a máxima produção de biomassa 11 g/L ocorreu após as 50 horas de cultivo.

O início da fase exponencial de crescimento de *C. lipolytica* UCP0988 foi observado com 4 horas de cultivo, prolongando-se até as 40 horas de cultivo. A velocidade específica de crescimento foi de $\mu_{esp.} 0,15 h^{-1}$, com tempo de geração T_G de 4,62 h. Após 48 horas de cultivo iniciou-se a fase estacionária de crescimento.

O pH inicial do meio de cultivo foi 5,5 e ao final com 72 horas de cultivo atingiu valores próximos a 7,0. Bednarski et al. (2004) estudaram a produção de biossurfactante por *Candida antarctica* ATCC20509 e *C. apicola* ATCC96134, utilizando um resíduo da refinaria de óleo, e observaram que a acidez do meio é um importante parâmetro, estando correlacionada com a síntese de biossurfactante do tipo glicolipídeos. Estudos realizados por Cunha e colaboradores (2004) sobre a produção de biossurfactante utilizando gasolina como substrato, o pH inicial foi de

7,5 atingindo valores próximos a 6,0 ao final da fermentação. Os resultados obtidos sugerem que cada microrganismo apresenta um pH específico para o tipo de biossurfactante produzido.

A maior produção de biossurfactante ocorreu na fase exponencial de crescimento, tendo sido evidenciado através da redução da tensão superficial do meio de cultivo de 50 mN/m para 25,29 mN/m (Figura 3). A produção de biossurfactante na idiofase (fase estacionária de crescimento) ocorre tendo em vista o microrganismo já ter produzido os metabólitos primários (trofofase), necessários para o seu desenvolvimento, a partir das fontes de carbono solúveis e insolúveis.

Os resultados obtidos são apoiados pelos estudos realizados por Sarubbo e colaboradores (1999, 2001), onde foi avaliada a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *Candida lipolytica* 1055 e 1120, utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono, respectivamente. A produção de bioemulsificantes foi observada na fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária. Os resultados obtidos aqui descritos concordam com Thompson e colaboradores (2000), que utilizaram efluentes de batata para produção de um biossurfactante, o surfactin, e a máxima produção de biossurfactante ocorreu na fase estacionária de crescimento, exibindo um bom índice de emulsificação e recuperando solos contaminados por óleos.

A Figura 4 ilustra a cinética de produção do biossurfactante por *C. lipolytica* UCP0988, através da determinação da atividade de emulsificação em condição otimizada (meio contendo 6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico). A atividade de emulsificação foi determinada durante a cinética de crescimento da *C. lipolytica* UCP0988 utilizando diferentes substratos: n-hexadecano, óleo de milho, de algodão e de canola. As maiores atividades foram de 4,8 U.A.E. a 5,5 U.A.E. para todos os substratos testados, permanecendo estáveis após as 48 horas de cultivo, com atividades de 4,5 U.A.E. As maiores atividades obtidas em estudos realizados por Kim e colaboradores (1996) foram de 2,5 U.A.E. e 2,69 U.A.E. para o n-hexadecano e o óleo de milho, respectivamente. Testes realizados por Ghurye e colaboradores (1994) demonstraram que a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Escherichia coli* JM101 não foi significativa, uma vez que as emulsões

formadas apresentaram valores em torno de 0,9 U.A.E. Como controle do teste de atividade de emulsificação alguns surfactantes comerciais foram testados e as atividades apresentaram valores abaixo de 2,58 U.A.E. (GHURYE et al., 1994)

Os valores de atividade de emulsificação obtidos no presente trabalho foram superiores aos obtidos pelo biossurfactante produzido por *C. lipolytica* quando cultivada em glicose (Sarubbo et al., 1999) e óleo de babaçu (Sarubbo et al., 2001).

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes temperaturas

A estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* foi avaliada através da tensão superficial, sendo um fator importante para sugerir a utilização do biossurfactante em condições ambientais extremas (Mulligan, 2005). A Figura 5 ilustra a influência da temperatura na tensão superficial do líquido metabólico da *C. lipolytica* obtido em condição otimizada.

Os resultados obtidos demonstraram a estabilidade do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* UCP0988, pois o mesmo, quando submetido a altas ou baixas temperaturas os valores de sua tensão superficial não apresentou grandes variações (Figura 5). Estudos realizados por Gusmão e colaboradores (2005) demonstraram que a tensão superficial do líquido metabólico produzido por *Candida glabrata* não apresentou alterações significativas quando aquecido a 70°C, com aumento da tensão superficial quando submetido a 4°C.

Os resultados obtidos por Brown e colaboradores (1985), para o biossurfactante produzido pela bactéria designada como isolado 1165 demonstraram uma redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células quando este foi submetido a temperaturas entre 0°C e 4°C, embora quando exposto a temperaturas elevadas (100°C e 120°C) tenha apresentado valores de tensão estáveis, entre 30,5 mN/m e 31,8 mN/m. Cameotra e Makkar (1998) observaram a estabilidade da tensão superficial após a exposição do biossurfactante produzido por *B. subtilis* à temperatura de 100 °C, com valores entre 27 mN/m e 28 mN/m.

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes valores de pH

A Figura 6 ilustra a influência do pH na estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico obtido em condição otimizada. Os resultados obtidos demonstram que o biossurfactante obtido não apresentou alterações significativas no valor de tensão superficial quando submetido a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10). Contudo, observou-se um discreto aumento na tensão superficial quando submetido ao pH 12. Segundo Ghurye e colaboradores (1994) a desnaturação de componentes protéicos ou o aumento da ionização do meio pode ocasionar a variação da tensão superficial em valores de pH extremos.

Para Abu-Ruwaida e colaboradores (1991), a influência do pH na tensão superficial demonstra que as variações do pH não causam grandes alterações nos valores da tensão superficial do líquido metabólico produzido por bactérias. O biossurfactante produzido por *Nocardia* sp. apresentou tensões superficiais estáveis frente a uma ampla faixa de pH (Cirigliano e Carman, 1984). Cameotra e Makkar (1998) também obtiveram valores estáveis ao longo da ampla faixa de pH para o líquido metabólico de *Bacillus licheniformis*.

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes concentrações de NaCl

A Figura 7 ilustra a influência de diferentes concentrações de NaCl na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico de *Candida lipolytica* obtido em condição otimizada. O biossurfactante produzido não apresentou alterações significativas na tensão superficial quando submetido a altas concentrações de NaCl. Estes resultados são bastante promissores, considerando que concentrações acima de 2% de NaCl são suficientes para inibir a atuação de surfactantes sintéticos, segundo Desai e Banat (1997); Kim et al., (2000).

Os resultados obtidos são apoiados por Abu-Ruwaida e colaboradores (1991), as mesmas concentrações de NaCl foram utilizadas e a tensão superficial também permaneceu constante independente da concentração de sal utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S, Salem, A., Kadri, M. 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria - Product characterization, and evaluation. *Acta Biotechnologica*. 2, 315-324.

Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., Plaszczyk, M. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*. 95, 15-18.

Brown, M.J., Foster, M., Moses, V., Robinson, J.P., Shales, S.W., Springham, D.G. – In: *Proceedings of the 3rd European Meeting on Improved Oil Recovery*, Rome (1985).

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

Cirigliano, M.C., Carman, G.M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environm. Microbiol.* 48, 747-750.

Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environm. Microbiol.* 53, 224-229.

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

Davila, A.M., Marchal, R., Vandecastelle, J.P. 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. Applied Microbiology and Biotechnology. 38, 6-11.

Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 61, 47-64.

Duff, R.J., Defeo, J.A., Robinson, R.A. 1973. Abstracts of Papers, 166th American Chemical Society National Meetings, Chicago, Micro, 28.

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

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

Ghurye, G.L., Vipulanandan, C., Willson, R.C. 1994. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 661-666.

Gusmão, C.A.B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A. Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* a partir de resíduo industrial como substrato. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 2005.

Kim, S.H., Lim, E.J., Choi, K.S., Jeong, Y.K., Lee, T.H. 1996. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24, 206-211.

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

Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., ritchkova, M.I. 2001. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. 46, 149-156.

Maier, R.M., Soberon-Chavez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 625-633.

Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 428-434.

Miranda, O.A., Salgueiro, A.A., Pimentel, M.C.B., Lima Filho, J.L., Melo, E.H. M., Durán, N. 1999. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technol.* 69, 145-147.

Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133, 183-198.

Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, 2nd edn. New York: John Wiley & Sons.

Nitschke, M., Pastore, G.M. 2002. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Quimica Nova*. 25, 772-776.

Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, G. 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35, 81-85.

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

Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environm. Microbiol. 3, 229-236.

Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Takaki, G.M.C. 2005a. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando substratos de baixo custo. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM). Recife-PE.

Rufino, R.D., Luna, J.M., Barros-Neto, B., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M. 2005b. Otimização da produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando como substratos resíduo industrial e ácido glutâmico. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM). Santos-SP.

Sarubbo, L.A., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M. 1999. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. Canadian Journal of Microbiology. 45, 423-426.

Sarubbo, L.A., Marçal, M.C., Neves, M.L.C., Silva, M.P.C., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M. 2001. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. Appl. Biochem. Biotechnol. 95, 59-67.

Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP1002. Eletronic Journal of Biotechnology. Online, 2006.

Sen, R., Swaminathan, T. 2005. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. Process Biochemistry. 40, 2953-2958.

Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I.W., Roller, S. 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* 40, 207-217.

Thanomsub, B., Watcharachaipong, T., Chotelersak, K., Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T. 2004. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *Journal of Applied Microbiology.* 96, 588-592.

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

Tuleva, B.K., Ivanov, G.R., Christova, N.E. 2002. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift fur Naturforschung.* 57, 356-360.

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

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

Zhou, Q-H., Kosaric, N. 1995. Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *JAOCS.* 72, 67-71.

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

Tabela 1 - Valores das variáveis independentes, do primeiro planejamento fatorial, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo

Tabela 2 - Valores das variáveis independentes, do segundo planejamento fatorial, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo

Tabela 3 - Valores das variáveis independentes, do terceiro planejamento, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo

Tabela 4 - Valores das variáveis independentes, do quarto planejamento, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo

Tabela 5 - Valores das variáveis independentes, do quinto planejamento, nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 72horas de cultivo

Figura 1 - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados das diferentes variáveis testadas na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*, após 72 horas de cultivo. As variáveis testadas foram: (1) resíduo, (2) ácido glutâmico e (3) extrato de levedura. Os efeitos dos compostos foram estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Figura 2 - Superfície de resposta de um modelo quadrático ajustado aos dados dos planejamentos fatoriais 3, 4 e 5 tendo como variável resposta a tensão superficial após 72 horas de cultivo de *Candida lipolytica*.

Figura 3 - Cinética de crescimento da *Candida lipolytica*, pH e tensão superficial do líquido metabólico obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)

Figura 4 - Produção do biossurfactante por *Candida lipolytica* determinada pela atividade de emulsificação do líquido metabólico obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)

Figura 5 - Influência da temperatura na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da determinação da tensão superficial do líquido metabólico de *Candida lipolytica*, obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)

Figura 6 - Influência do pH na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico de *Candida lipolytica*, obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)

Figura 7 - Influência da concentração de NaCl na estabilidade do biossurfactante, avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico de *Candida lipolytica*, obtido em condição otimizada (6% do resíduo e 1% de ácido glutâmico)

Tabela 1

	Resíduo	Extrato de levedura	Ácido glutâmico	Tensão superficial (mN/m)
Condição 1	-1	-1	-1	38,99
Condição 2	+1	-1	-1	34,25
Condição 3	-1	+1	-1	44,08
Condição 4	+1	+1	-1	37,16
Condição 5	-1	-1	+1	41,77
Condição 6	+1	-1	+1	26,32
Condição 7	-1	+1	+1	43,41
Condição 8	+1	+1	+1	29,22
Condição 9	0	0	0	40,97
Condição 10	0	0	0	38,72
Condição 11	0	0	0	41,71
Condição 12	0	0	0	42,49

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: resíduo, 1% (-1) e 4% (+1); Extrato de levedura, 0% (-1) e 0,2% (+1); ácido glutâmico, 0% (-1) e 1% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: resíduo, 2,5%; extrato de levedura, 0,1%; ácido glutâmico 0,5%

Tabela 2

	Resíduo	Ácido glutâmico	Tensão superficial (mN/m)
Condição 1	-1	-1	28,78
Condição 2	+1	-1	26,68
Condição 3	-1	+1	26,96
Condição 4	+1	+1	26,62
Condição 5	0	0	26,63
Condição 6	0	0	26,44
Condição 7	0	0	26,59

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: resíduo, 4% (-1) e 8% (+1); ácido glutâmico, 1% (-1) e 2% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: resíduo, 6%; ácido glutâmico 1,5%

Tabela 3

	Resíduo	Ácido glutâmico	Tensão superficial (mN/m)
Condição 1	-1	-1	33,43
Condição 2	+1	-1	25,76
Condição 3	-1	+1	27,07
Condição 4	+1	+1	26,42
Condição 5	0	0	26,82
Condição 6	0	0	26,44
Condição 7	0	0	26,60

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: resíduo, 5% (-1) e 7% (+1); ácido glutâmico, 1,25% (-1) e 1,75% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: resíduo, 6%; ácido glutâmico 1,5%

Tabela 4

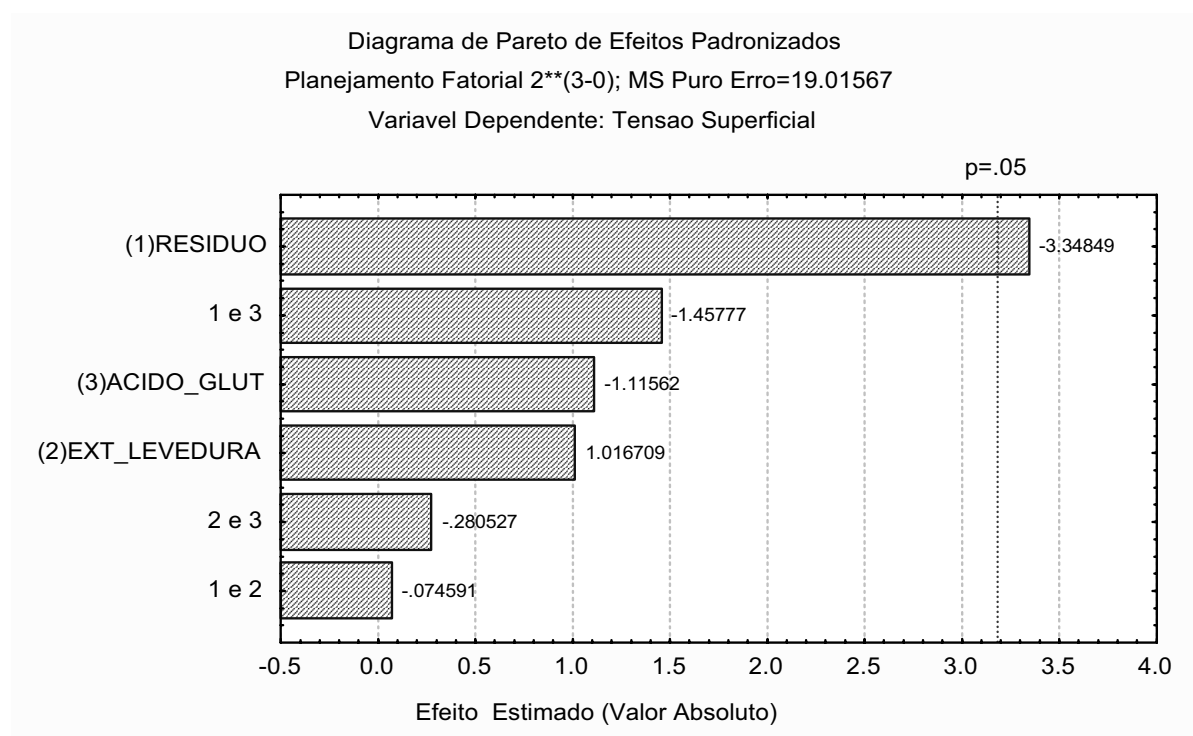
	Resíduo	Ácido glutâmico	Tensão superficial (mN/m)
Condição 1	-1	-1	25,29
Condição 2	+1	-1	26,71
Condição 3	-1	+1	26,60
Condição 4	+1	+1	25,99
Condição 5	0	0	25,76
Condição 6	0	0	25,68
Condição 7	0	0	25,70

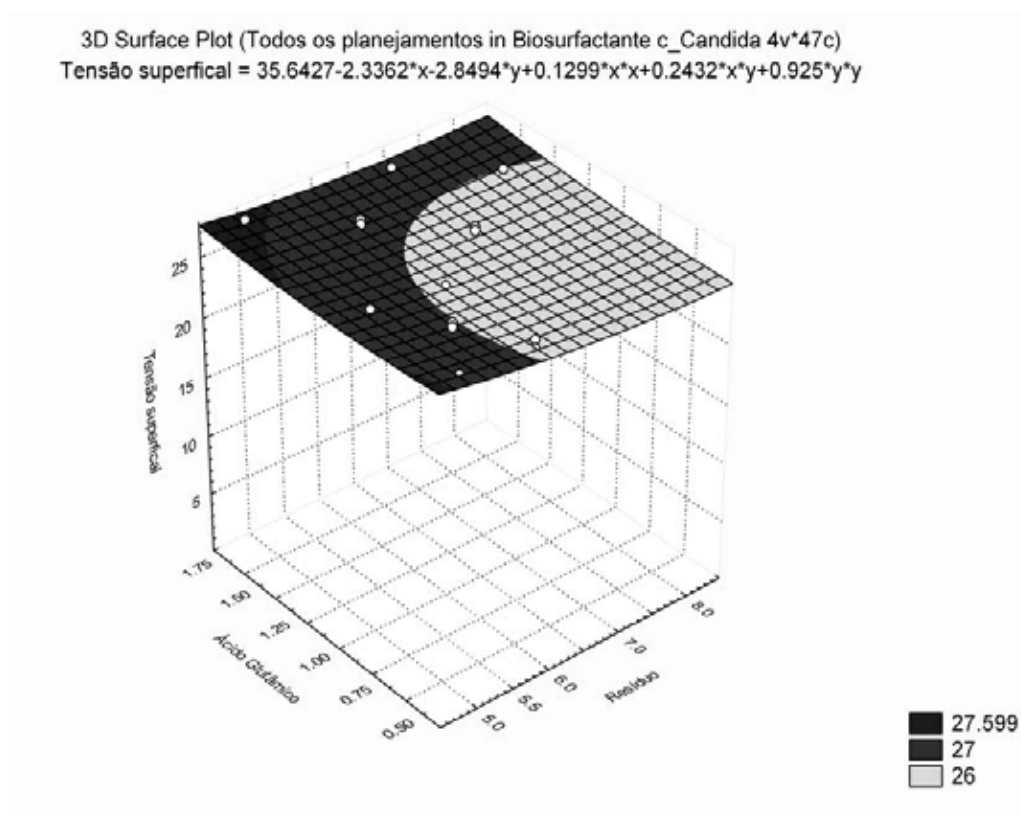
As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: resíduo, 6% (-1) e 8% (+1); ácido glutâmico, 1% (-1) e 1,5% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: resíduo, 7%; ácido glutâmico 1,25%

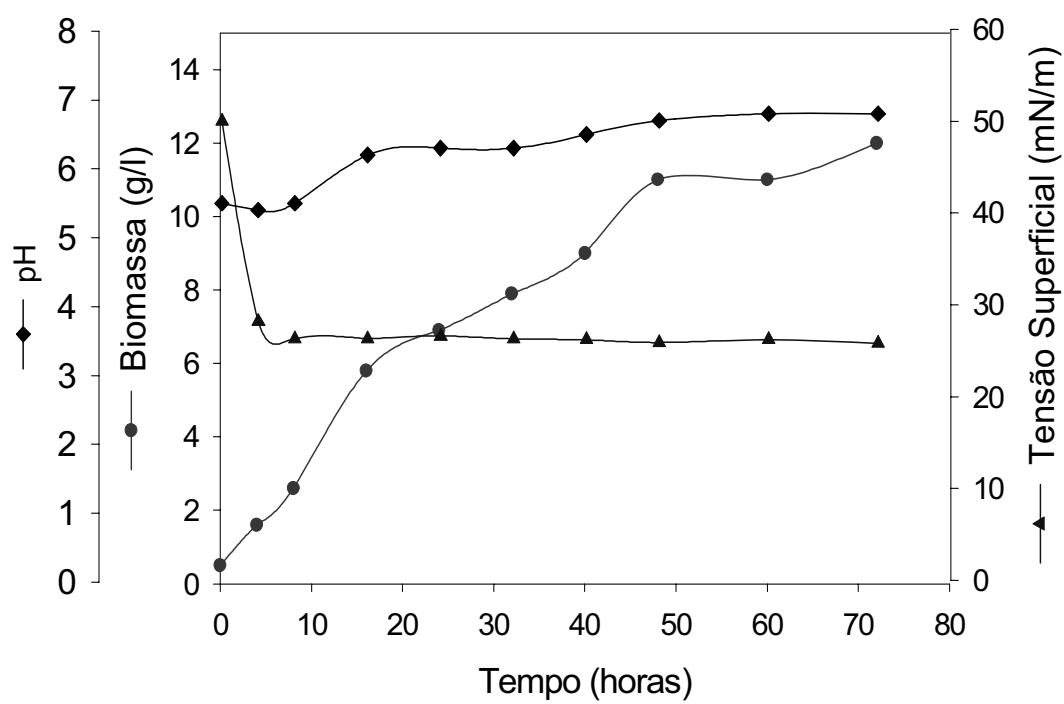
Tabela 5

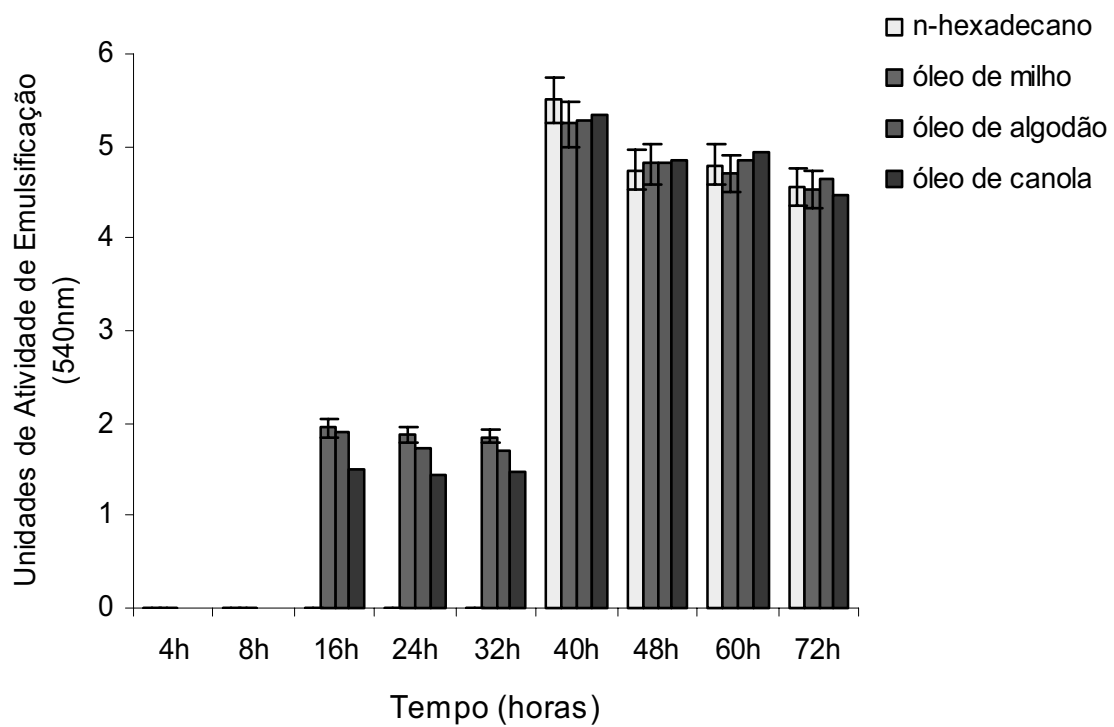
	Resíduo	Ácido glutâmico	Tensão superficial (mN/m)
Condição 1	-1	-1	26,34
Condição 2	+1	-1	25,65
Condição 3	-1	+1	26,58
Condição 4	+1	+1	25,29
Condição 5	0	0	26,70
Condição 6	0	0	26,35
Condição 7	0	0	26,50

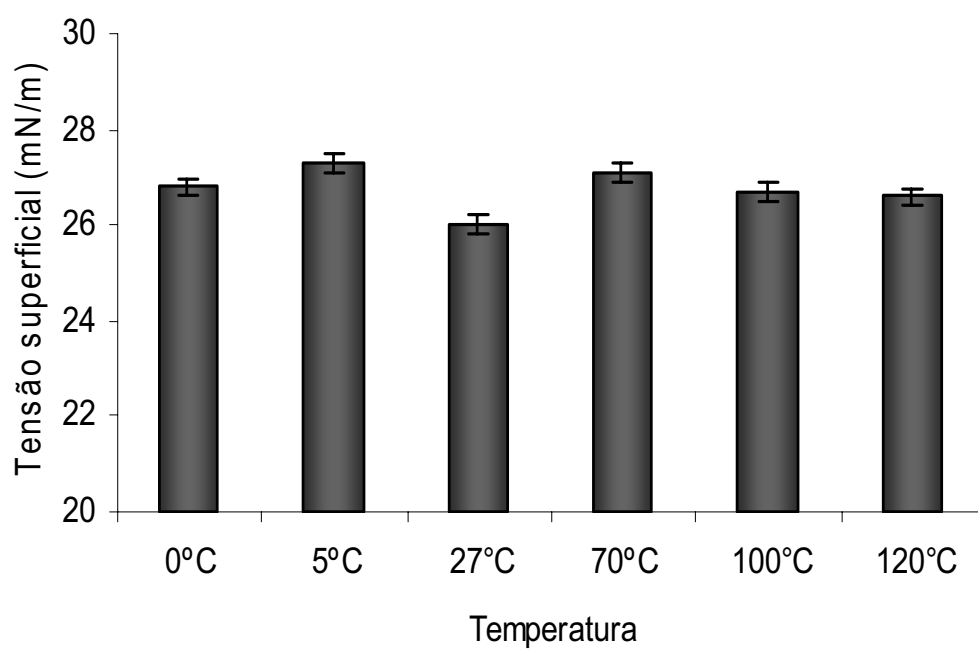
As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: resíduo, 5% (-1) e 6% (+1); ácido glutâmico, 0,5% (-1) e 1% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: resíduo, 5,5%; ácido glutâmico 0,75%

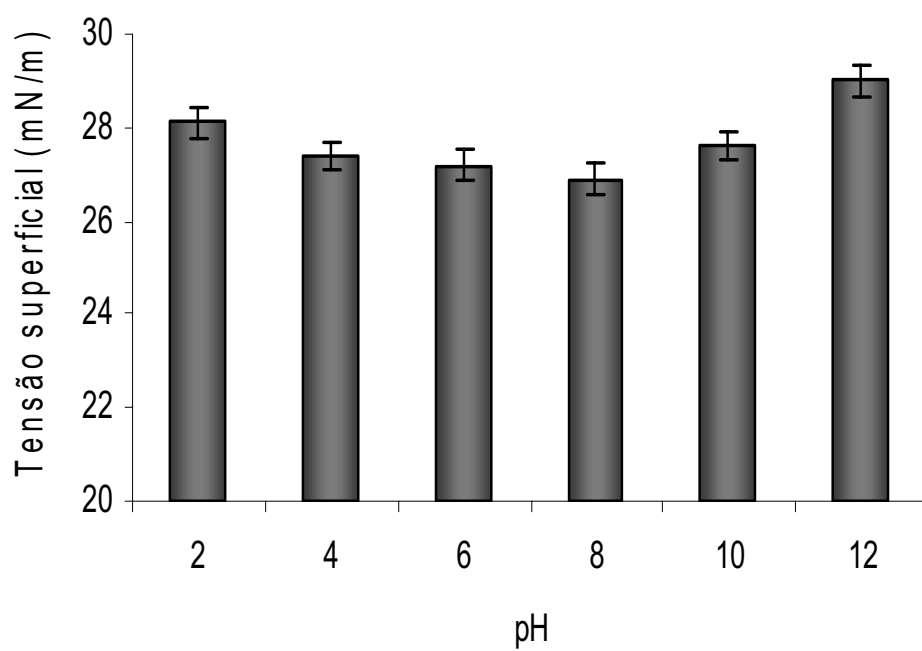
**Figura 1**

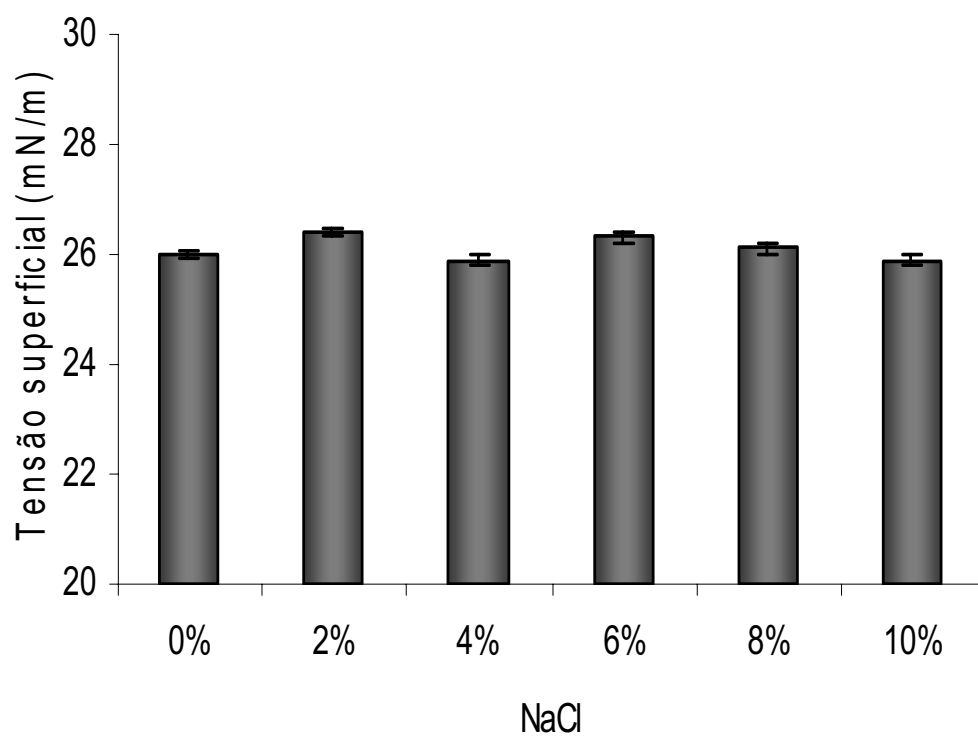
**Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**

**Figura 5**

**Figura 6**

**Figura 7**

CONCLUSÕES

ARTIGO I:

- O biossurfactante produzido apresenta alta atividade de emulsificação para o óleo motor;
- O índice de emulsificação do biossurfactante produzido não apresenta alterações consideráveis, quando submetido a diferentes temperaturas e concentrações de NaCl;
- O rendimento máximo da produção de biossurfactante é na fase estacionária de crescimento;
- A caracterização preliminar do biossurfactante produzido demonstra sua natureza polimérica.

ARTIGO II:

- A utilização de planejamentos fatoriais como ferramenta estatística é de grande importância na formulação de experimentos microbiológicos;
- As interações entre o resíduo industrial e o ácido glutâmico, entre o extrato de levedura e o ácido glutâmico e entre o resíduo e o extrato de levedura, produziram efeitos positivos, não significativos, sobre a redução da tensão superficial;
- O biossurfactante produzido reduz consideravelmente a tensão superficial da água;
- O biossurfactante produzido não apresenta alterações significativas quando submetido a diferentes temperaturas, diferentes valores de pH e concentrações de NaCl;
- O biossurfactante produzido demonstra potencial de utilização como agente surfactante e emulsificante.

ANEXOS

NORMAS ARTIGO I

Biotechnology Progress

Preparation and Submission of Manuscripts

(Revised January 2006)

Transfer of Copyright Agreement

A properly completed Transfer of Copyright Agreement must be provided for each submitted manuscript. The form is available from the Web site and is printed in the first issue of each year. The completed, signed, and dated form should be faxed to the Editor's office.

Cover Letter

A cover letter must accompany each submitted manuscript and may be created electronically on the Web submission site. The letter should provide the corresponding author's name, postal and e-mail addresses, and telephone and fax numbers. Unless different instructions are furnished in the cover letter, all Editorial correspondence concerning receipt, status, review, revision, and publication of manuscripts will be sent only to one person who has been assigned as the "corresponding author" during the evaluation period. The corresponding author is responsible for communicating the manuscript status to all coauthors of the paper. The letter should address the significance of the manuscript, provide a list of at least six (6) keywords, and list any graphics for which color is requested. Authors are also urged to provide the names and email addresses of recommended reviewers. The letter should also indicate the author's preference for Web or hardcopy page proofs, and this selection should also be made via the submission form.

Manuscript Submission

Complete instructions and an overview of the electronic (Web) submission process are available through the secure ACS Web site at <http://pubs.acs.org/BP>; select "submit manuscript". Authors electing to submit via the Web will also submit the final revised versions of manuscripts via the Web.

When preparing manuscripts, it is essential that only the fonts specified in the ACS manuscript templates be used. If an author chooses not to use an ACS template to prepare a submission, Times and Symbol fonts should be used. Use of other fonts may cause problems during peer review and journal production.

When creating the PDF files for submission, it is essential that all fonts be embedded within the PDF file. For best results, please download the ACS Job Options file for Adobe Distiller. This file will set the Distiller Options to be the same as those used on the ACS PDF conversion servers. Instructions on use of the ACS Job Options file can be found on the Web site (<http://pubs.acs.org/BP>; select "submit manuscript", then "Read Author Information").

Preparation of Manuscripts

Artwork and tables should be inserted within the text of the document showing actual placement. This insertion of graphics will provide for ease in review. All pages of the manuscript must be numbered consecutively, and all files must be saved and printed in U.S. Letter size format. Authors should consult recent issues of the journal and *The ACS Style Guide*, 2nd ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997 for further format guidance. (*The ACS Style Guide* is available from Oxford University Press, <http://www.oup-usa.org>, ISBN 0-8412-3462-0).

Any author who is not fully fluent in idiomatic English is urged to obtain assistance with manuscript preparation from a fluent colleague. Manuscripts with grammar or vocabulary deficiencies are handicapped during the scientific review process

and may be returned to the author before peer review and/or before acceptance for rewriting in idiomatic English.

Title. The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct.

Author List. Include in the byline all those who have made substantial contributions to the work. Use first names, initials, and surnames (e.g., John R. Smith). Do not use only initials with surnames (e.g., J. R. Smith) because this causes indexing and retrieval difficulties and interferes with unique identification of an author. Do not include professional or official titles or academic degrees. At least one author must be designated with an asterisk as the author to whom correspondence (regarding the published manuscript) should be addressed, and appropriate phone, fax, and email information should be provided.

Address. The affiliation(s) listed should be the institution(s) where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, the current address should be given in a footnote.

Abstract. All manuscripts must contain a short abstract, which should briefly state the reason for the work, the significant results, and the conclusions.

Text. The first paragraphs should explain what the motivation and import of the work is, where it fits in the development of the field, and perhaps why it should be of interest to researchers in other areas. It should be possible to do this without excessively increasing the length of the paper. Thoughtful use of schemes and diagrams (with well-composed captions) is recommended, so that even casual browsers can discern the nature of the work. Well-known procedures should be designated by name or literature references to them should be given. Experimental results are of lasting value and should be clearly and logically presented in separate sections. The addition of a Conclusion section at the end of the paper, which briefly summarizes the principal conclusions of the work, is recommended. If desired for clarification, section headings may be given Arabic numbers and subsections numbered in decimals (example, subsection 2.1 and subsection 2.2).

Acknowledgment. Dedications and notes acknowledging financial assistance to the conduct of research, citing theses, or indicating presentation at a meeting should be brief and placed in the Acknowledgment section.

Supporting Information Statement. A brief statement in nonsentence format, listing the contents of material placed in Supporting Information, should be included at the end of the manuscript (after the Acknowledgment and before the References). For instructions on what material should be provided as Supporting Information and on preparing it for publication, see the Supporting Information section below.

Figures. All figures must be mentioned in the text in consecutive order and be numbered with Arabic numerals. A caption giving the figure number and a brief description, preferably only one or two sentences, must be included with each figure. The caption should be understandable without reference to the text. It is preferable to place the keys to symbols used in the artwork itself, not in the caption. Ensure that any symbols and abbreviations used in the text agree with those in the artwork.

Schemes. Sequences of reactions are called schemes. Schemes may have brief titles describing their contents. Schemes should be numbered with Arabic numerals.

Charts. Groups of structures that do not show reactions are called charts and should be numbered consecutively with Arabic numerals. Charts may have brief titles describing their contents.

Tables. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each table must have a brief (one phrase or sentence) title that describes its contents. The title should be understandable without reference to the text. Details should be put in footnotes, not in the title. Tables should be used when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented, or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. Tables should supplement, not duplicate, information presented in the text and figures. Tables should be simple and concise. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by line rather than by column.

In setting up tables, authors should keep in mind the type area of the *Biotechnology Progress* page (17.8 × 25.0 cm) and the column width (8.5 cm) and should make tables conform to the limitations of these dimensions.

References and Notes. References and explanatory notes should be listed on a separate sheet in numerical order according to the order in which they appear. Authors are responsible for checking the accuracy and completeness (including all authors) of all references. Because subscribers to the Web edition of the journal are now able to click on the "CAS" tag following each reference to retrieve the corresponding CAS abstract, reference accuracy is critical. References should be cited in the text as italic numbers enclosed in parentheses, e.g. (1). Use *Chemical Abstracts Service Source Index* journal abbreviations and refer to *The ACS Style Guide* (1997) for style. Include the titles of journal articles as well as those for books. Typical citations are illustrated below:

- (1) Wang, X.; Da Silva, N. A. Estimation of the Rate of Cloned Gene Integration via Retrotransposition. *Biotechnol. Prog.* 1997, 13, 123–131.
- (2) Dordick, J. S. Principles and Applications of Nonaqueous Enzymology. In *Applied Biocatalysis*; Blanch, H. W., Clark, D. S., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1991; Vol. 1, pp 1–52.

Artwork

All graphics (illustrations) should be inserted at their appropriate locations in the word-processor file within the manuscript text. Follow the Web instructions for manuscript preparation: <http://pubs.acs.org/BP>; select "submit manuscripts".

The quality of the graphics in the journal depends on the quality of the originals provided by the author. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. Whenever possible, the graphics files furnished by authors with Web submission are used in production of the journal.

Illustrations must fit a one- or two-column format on the journal page: **For efficient use of journal space, single column illustrations are preferred.**

	Single (preferred)	Double
Width		
minimum		10.5 cm (4.13 in.)
maximum	8.25 cm (3.25 in.)	17.78 cm (7 in.)
Maximum depth	24 cm (9.5 in.)	24 cm (9.5 in.)

For best results, submit illustrations in the actual size at which they should appear in *Biotechnology Progress*. Original illustrations which do not need to be reduced to fit a single or double column will yield the best quality. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density and the lines unbroken.

If the submitted artwork must be reduced, larger lettering and thicker lines should be used so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned criteria.

Avoid using complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect. To show a pattern, choose parallel lines or a simple crosshatch design.

Photographs. High-contrast prints with a smooth or glossy finish work best. Send photographs that are single or double column width so that they will not have to be reduced. Do not submit negatives, slides, or overhead transparencies. Avoid photographs produced on a laser printer and prints cut from a printed publication; these do not give good results. Do not write on the front or back of the image area of the photograph. These marks may show through when the photograph is scanned.

Color. Color reproduction, if approved by the Editor, will be provided at no cost to the author. Color illustrations should be submitted *only* if essential for clarity of communication, and all other artwork should be submitted as black and white originals or files. Graphics intended to appear in black-and white or grayscale should not be submitted in color.

Resolution. Graphics submitted digitally should have the following minimum resolution requirements.

Black and white line art	1200 dpi
Grayscale art	600 dpi
Color art	300 dpi

Supporting Information

General Considerations. Material that is not needed for reading the paper but which should be available to document the experiments or calculations for future researchers should be put into the Supporting Information. This material may include tables, illustrations, derivations, experimental procedures, analytical and spectral characterization data, modeling coordinates and programs, and crystallographic information files. This section may also include additional material or discussion that is primarily of interest to specialized readers. Authors are encouraged to make use of Supporting Information in the interest of shorter Articles, not only to save space but also to create more focused presentations.

Supporting Information should be submitted at the same time as the original manuscript. Refer to the Supporting Information in the text where appropriate and include a paragraph at the end of the paper indicating the nature of the Supporting Information, using the following format: "Supporting Information Available: [description of material] This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>."

Material deposited as Supporting Information is considered to be part of the publication and should not be submitted for republication as part of a future paper.

These instructions and a Transfer of Copyright Agreement are printed in the first issue of each volume. When submitting manuscripts, please conform to these detailed instructions, which are also available via the Web at <http://pubs.acs.org/BP> (select "info for authors").

NORMAS ARTIGO II

Bioresource Technology



<http://www.elsevier.com>

BIORESOURCE TECHNOLOGY

Guide for Authors

Guide for Authors - Contents list:

Short Overview

Manuscript Preparation:

- General
- Structure
- Text Layout
- Corresponding Author
- Abstract
- Keywords
- Symbols
- Units
- Maths
- References
- Illustrations
- Colour Costs and Queries
- Free Online Colour
- Tables
- Electronic Annexes
- Supplying the Final Accepted Print Version with Disk

Other:

- Notification
- Copyright
- PDF Proofs
- Author Benefits
- Online Paper Tracking
- Enquiries
- Useful Links

Short Overview

Submission of papers:

By Mail: Manuscripts (1 original and 2 copies) accompanied by a covering letter should be sent to the relevant submission address. Only after final acceptance a disk/CD ROM needs to be sent with the hardcopy.

Submission address:

Papers from North and South America: Dr S.C.Ricke, Department of Poultry Science, 101 Kleberg Center, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2472, USA;

Papers from Europe, Middle East and Africa: Dr Julian A.S. Goodwin,

Bioresource Technology, c/o Elsevier Ltd, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington Oxford, OX5 1GB, UK;
Papers from Asia-Pacific region: Professor Ashok Pandey, Head of Biotechnology Division, Regional Research Laboratory CSIR, Trivandrum 695 019, India.

Submission language: English (Link to the Oxford English Dictionary <http://dictionary.oed.com/entrance.dtl>)

English language help service: Upon request Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Original material: Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Editor's requirements: No special requirements for this journal.

Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing.

[Back to the contents list](#)

Manuscript Preparation:

General:

Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use. An electronic copy of the manuscript on disk should accompany the final accepted version. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to <http://www.elsevier.com/locate/latex>.)

[http://www.elsevier.com/locate/latex](#))
[Back to contents list](#)

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. For submission in hardcopy, do not import figures into the text - see Illustrations. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on

the title page, as a footnote to the title or otherwise.

[Back to the contents list](#)

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.)

Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript.

If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 or 10 pt font size and standard fonts. If submitting in hardcopy, print the entire manuscript on one side of the paper only.

[Back to the contents list](#)

Corresponding author:

Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

[Back to the contents list](#)

Abstract:

Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

[Back to the contents list](#)

Keywords:

Immediately after the abstract, provide a maximum of ten keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

[Back to the contents list](#)

Symbols:

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Units:

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used.

[Back to the contents list](#)

Maths:

Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

References:

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

[Back to the contents list](#)

Supplying Final Accepted Text on Disk:

Once the paper has been accepted by the editor, an electronic version of the text should be submitted together with the final hardcopy of the manuscript. **The electronic version must match the hardcopy exactly.** We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX (see also <http://www.elsevier.com/locate/latex>) is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Label the disk with your name, the journal title and any software used. Save your files using the default extension of the program used.

Electronic files can be stored on 3.5 inch diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh).

[Back to the contents list](#)

Notification:

Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production.

[Back to the contents list](#)

Copyright:

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

For more information please go to our copyright page

<http://authors.elsevier.com/copyright>.

[Back to the contents list](#)

PDF Proofs:

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting.

For more information on proofreading please go to our proofreading page <http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print.

[Back to the contents list](#)

Author Benefits:

No page charges: Publication in this journal is free of charge.

Free offprints: Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Corresponding authors will be given the choice to buy extra offprints before printing of the article. Authors who pay for colour illustrations will receive an extra fifty offprints free of charge.

Author discount: Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books. See

<http://www.elsevier.com/homepage/booksbutler> for more information.

[back to the contents list](#)

Online Paper Tracking:

Authors can track the status of their accepted paper online at <http://authors.elsevier.com> using the reference supplied by the publisher.

[back to the contents list](#)

Author enquiries:

All author enquiries should be made to: authorsupport@elsevier.ie

Useful links: •Register free to personalise Author Gateway features, by creating a profile •Submission Checklist can be downloaded •Track a paper•Email alerts can be set up here, by creating a profile • If you are interested in submitting a book in this area, see <http://authors.elsevier.com/books>