

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE UM CONSÓRCIO
ESPECIALIZADO E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL NA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES EM FONTES
ALTERNATIVAS DE CARBONO**

Fábio Raphael Accorsini
-Biólogo-

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
MAIO DE 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE UM CONSÓRCIO
ESPECIALIZADO E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL NA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES EM FONTES
ALTERNATIVAS DE CARBONO**

Fábio Raphael Accorsini

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Maria Benincasa Vidotti

Co-Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Marcia Justino Rossini Mutton

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2010

A172i	Accorsini, Fábio Raphael Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono / Fábio Raphael Accorsini- Jaboticabal, 2010. X, 76 f : il. ; 28 cm Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Orientador: Maria Benincasa Vidotti Banca examinadora: Giovana Tommaso, Jackson Antonio M. de Souza Bibliografia 1 Biossurfactantes, 2. <i>Cândida sp</i>, 3Fontes de carbono, 4. Leveduras, 5 Resíduos agroindustriais- I.Título. II. Jaboticabal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. CDU 576.8:663.12
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e tratamento da informação- Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FÁBIO RAPHAEL ACCORSINI – Nascido a primeiro de fevereiro do ano de 1985 em Sertãozinho /SP. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em Março de 2004 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - (FCAV-UNESP), concluindo sua licenciatura em dezembro de 2007 e seu bacharelado em agosto de 2008. Em março de 2008 deu início ao curso de pós- graduação em Microbiologia Agropecuária.

À minha família:
*meus pais, **Francisco e Marilza;***
*meus avós, **Maria aparecida e Francisco,***
***Amélia e Pedro** “in memorian”*
*meu irmão **Frederico,***
*minha namorada **Adrielle...***

por serem, simplesmente, quem são e
por tudo que representam em minha vida.
A existência de vocês é minha festa interior.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a minha existência até aqui.

A Prof. Dra. Maria Benincasa Vidotti agradeço profundamente por ter assumido a orientação desta dissertação, tendo-me brindado com a oportunidade da realização desse sonho, tempo dispensado e paciência, dosando as críticas com comentários de incentivo.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, pela confiança e amizade. Agradeço imensamente.

Ao Douglas Antonio Paixão, Viviane Schuch e a técnica Eliane pela colaboração e apoio em muitos momentos ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

A Prof. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, e toda a sua equipe em especial a Elisangela Gomes, Tereza Castellane e ao técnico de laboratório João Carlos.

Aos amigos Natália Meloni, Marcos André, Mariluci, Gisele, Léo, Edna (secretária da micro), Jhoanne, Leandro, Cláudio e a todos professores membros do conselho da “micro”. Colegas estes que compartilharam idéias, opiniões e principalmente muitas gargalhadas tornando a realização deste trabalho muito mais fácil e agradável. Para vocês “Aquele abraço”.

A Copercana em especial ao químico Francisco José Accorsini, pelas análises realizadas. A FCAV/UNESP, em especial ao Departamento de Biologia agropecuária por ceder o espaço para realização do trabalho, e aos funcionários que de uma maneira ou de outra estiveram sempre presentes. A Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, ao IFS e FAPESP, pelo financiamento das pesquisas.

E aos que eventualmente me esqueci de mencionar, uma vez que a está altura do campeonato, pouca memória disponível me resta.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIÇÃO E UNIDADES	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Leveduras.....	3
2.1.2. Características Gerais.....	3
2.2. Surfactantes.....	4
2.3. Biossurfactantes.....	4
2.3.1. Áreas de aplicação.....	5
2.3.2. Classificação e natureza química dos biossurfactantes.....	6
2.3.3. Microrganismos Produtores.....	6
2.3.4. Condições de cultivo	8
2.4. Produção de Biossurfactantes por Leveduras.....	10
2.5. Isolamento de leveduras produtoras de biossurfactantes.....	12
2.5.1. Fontes de carbono utilizadas para a produção de biossurfactantes por leveduras.....	12
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Coleta e análises do solo.....	19
4.1.1. Coleta do solo.....	19
4.1.2. Extração do T.P.H. das amostras.....	19
4.1.3. Análises físicas e químicas do solo.....	20
4.2. Obtenção do inóculo original.....	20
4.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	21
4.4. Isolamento das leveduras.....	22
4.5. Caracterização dos isolados.....	22
4.5.1. Caracterização dos isolados em meio cromogênico CHROMagar TM Cândida.....	22
4.6. Ensaio para verificação da capacidade de produção de biossurfactantes.....	23
4.6.1. Preparo do inóculo.....	23
4.6.2. Meios de cultivo com fontes de carbono convencionais.....	23
4.6.3. Meios de cultivo com fontes de carbono alternativas.....	24
4.6.4. Meios de cultivo com mistura de fonte de carbono convencional e alternativa.....	24
4.6.5. Métodos analíticos dos bioprocessos.....	24
4.6.6. Determinação da tensão superficial.....	25

4.6.7.	Determinação da Biomassa seca.....	25
4.6.8.	Extração e quantificação dos biossurfactantes obtidos.....	25
4.6.9.	Análise da atividade surfactante dos produtos obtidos.....	25
4.7.	Análise físico -química da vinhaça.....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1.	Características do solo.....	27
5.1.1.	Análises físico - química do solo.....	27
5.1.2.	Hidrocarbonetos totais presentes na amostra.....	28
5.2.	Análise físico -química da vinhaça.....	28
5.3.	Isolamento das leveduras do solo contaminado.....	29
5.3.1.	Obtenção do consórcio de leveduras.....	29
5.3.2.	Microscopia eletrônica de varredura.....	29
5.3.3.	Isolamento das leveduras.....	30
5.4.	Caracterização dos isolados.....	36
5.4.1	Caracterização dos isolados em meio cromogênico CHROMagarTM Cândida.....	36
5.5.	Ensaio para verificação da capacidade de produção de biossurfactantes.....	41
5.5.1.	Meios de cultivo com fontes de carbono convencionais.....	41
5.5.1.1.	Óleo de soja.....	41
5.5.1.2.	Petróleo e óleo diesel.....	44
5.5.1.3.	Glicose.....	45
5.5.2.	Meios de cultivo com fontes de carbono alternativas.....	48
5.5.2.1.	Óleo de soja queimado.....	48
5.5.2.2.	<i>Soapstock</i> e <i>Soapstock</i> pH inicial 6.....	50
5.5.2.3.	Glicerol.....	53
5.5.3.	Meios de cultivo com mistura de fonte de carbono fontes de carbono alternativas e convencionais	55
5.5.3.1.	Vinhaça e óleo de soja.....	55
5.5.3.2	Combinação de substratos alternativos e convencionais.....	57
5.6.	Atividade surfactante dos produtos obtidos.....	60
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE ABREVIações E UNIDADES

A.R.T = Açúcares Redutores Totais

B.H.B. = Bushnell Haas – Broth

Cetesb = Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

E.O.T. = Extrato Orgânico Total

L.B.P.F = Laboratório de Biorremediação e Processos Fermentativos

M.E.L = Manosileritritol lipídio

MAPA = Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária

mN/m = Unidade de medida de Tensão Superficial(mili-Newton por metro)

T.P.H = Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono. RESUMO- Biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por vários microrganismos, dentre esses microrganismos as leveduras se destacam por produzi-los em ampla escala. Para que a produção seja economicamente viável é sugerido o uso de fontes de carbono alternativas. O presente trabalho teve por objetivo isolar leveduras e verificar a capacidade de produção de biossurfactantes em fontes de carbono convencionais e alternativas. A partir de um consórcio microbiano enriquecido, foram isoladas sete leveduras e todas apresentaram potencial de produção de biossurfactantes em óleo de soja. O isolado LBPF 3, caracterizado como *Candida antarctica*, obteve o maior rendimento de produto com uma produção final de 13,86 g/L. Os isolados LBPF 7, caracterizado como *Candida albicans*, LBPF 9, LBPF 10, caracterizados como *Candida glabrata*, e LBPF 15, caracterizado como *Candida albicans* apresentaram potencial de produção de biossurfactantes em resíduos agroindustriais, com destaque para LBPF 9 que obteve a maior redução na tensão superficial do seu meio utilizando glicerol como substrato, aproximadamente 43% com 24 horas de incubação. A caracterização presuntiva dos isolados através da utilização de meios cromogênicos evidenciou a predominância do gênero *Candida*. Os produtos obtidos pelos isolados apresentaram atividade surfactante reduzindo a tensão superficial da água para valores que variaram de 34 mN/m para os produtos produzidos pelos isolados LBPF 3 e LBPF 7, a 43 mN/m para o isolado LPPF 9, utilizando glicerol como substrato. Conclui-se que o enriquecimento e posterior “screening” realizados para obtenção das leveduras foram eficientes. Os isolados demonstraram possuírem potencial para produção de biossurfactantes tanto em fontes de carbono convencionais como em resíduos agroindustriais, principalmente o glicerol. Portanto, esses microrganismos podem ser utilizados em condições otimizadas para a produção de um bioproduto de alto valor agregado empregando-se fontes de carbono alternativas, podendo viabilizar o processo em escala industrial.

PALAVRAS -CHAVE- Glicolipíós, *Candida sp*, Fontes de carbono, Leveduras, Glicerol.

Yeasts isolation from a specialized microbial consortium and assessment of their potential to produce biosurfactants using alternative carbon sources.

ABSTRACT- Biosurfactants are bioactive agents that can be produced by many different microorganisms. Of these, yeasts stand out since they can produce these bioproducts in large scale. For this production to be economically viable, the use of alternative carbon sources is recommended. In the present study, different yeast strains were isolated to verify their capacity for producing biosurfactants using conventional and alternative carbon sources. From a enriched microbial consortium, seven different yeasts were isolated, and all showed potential for the production of biosurfactants in soybean oil. Isolate LBPF 3, characterized as species *Candida antarctica*, obtained the highest production: 13.86 g/L. Isolate LBPF 7, characterized as *Candida albicans*, isolates LBPF 9 and LBPF 10, each characterized as *Candida glabrata*, and yet LBPF 15, characterized as *Candida albicans*, all presented potential for the production of biosurfactants in agroindustrial residue. Of these, LBPF 9 stood out by obtaining the highest reduction of surface tension in its medium, approximately 43% after 24 hours, using glycerol as substrate. Presumptive characterization of the isolates was done by chromogenic analysis and showed a predominance of the *Candida* genera. The products obtained by the isolates presented surfactant activity which reduced the surface tension of water to values that varied from 34 mN/m, for the product obtained from isolates LBPF 3 and LBPF 7, to 43 mN/m for the isolate LBPF 9, all using glycerol as substrate. The obtained results led to the conclusion that the processes of enrichment and posterior screening, used for obtaining the yeasts, were efficient. The assessed isolates all showed potential for the production of biosurfactants in conventional sources of carbon as well as in agroindustrial waste, especially in glycerol. Therefore, the considered yeast strains could be evaluated and used in the production of a bioproduct which would be of high aggregated value and which uses alternative carbon sources besides being viable for industrial mass production.

KEY-WORDS- Glycolipds, *Candida sp*, Carbon sources, Yeasts, Glycerol.

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes de origem microbiana – biossurfactantes - ultimamente têm atraído grande interesse por apresentarem vantagens em relação aos seus similares químicos como: biodegradabilidade, compatibilidade com o ambiente, efetividade em condições ambientais adversas, menor toxicidade e possibilidade de serem produzidos a partir de fontes renováveis. Esse interesse aumenta quando se considera o amplo campo de aplicação industrial desses compostos que é muito diversificado, com destaque para: indústrias petrolíferas, químicas, de alimentos, farmacêutica, agricultura, etc.

A maioria dos estudos se refere à produção de biossurfactantes por bactérias, sendo poucos os estudos voltados para a produção desses bioprodutos por leveduras.

As leveduras são conhecidas pela produção em grande escala de biossurfactantes quando comparadas às bactérias. Dentre as espécies de leveduras, as do gênero *Candida* são as mais estudadas e empregadas com muito êxito na obtenção desses produtos. As leveduras desse gênero também são conhecidas por serem facilmente isoladas de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e utilizarem uma grande variedade de fontes de carbono.

O uso de leveduras para a obtenção desses compostos, apesar da alta produção, ainda é limitada pelo alto custo dos substratos utilizados, assim uma alternativa para obtenção de biossurfactantes de forma economicamente competitiva seria utilizar substratos de baixo custo em seu processo de síntese. Nesse sentido, resíduos agroindustriais vêm sendo estudados como potenciais substratos. A utilização desses resíduos na obtenção de produtos de alto valor comercial não somente leva a um processo mais econômico, como principalmente, contribui de forma significativa para a minimização do volume de material poluente a ser disposto no ambiente.

Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi isolar leveduras de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e estudar seu potencial para a produção de biossurfactantes glicolipídicos quando cultivadas em substratos contendo resíduos agroindustriais como fonte de carbono, com ênfase nos resíduos das indústrias de óleo vegetal e bicomustíveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leveduras

2.1.1 Características gerais

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem vegetativamente por brotamento ou fissão. Algumas leveduras transformam-se em um estágio micelial sob certas condições ambientais, enquanto outras permanecem sempre unicelulares. (ARAUJO, 2006). Em comparação aos outros fungos as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente e são mais eficientes na realização de alterações químicas, como consequência de seu metabolismo. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. Existem, aproximadamente, 350 espécies diferentes de leveduras, separadas em cerca de 39 gêneros (AMORIM & SOUZA, 2005).

As células de leveduras podem apresentar várias formas, as quais podem ser o resultado da maneira de reprodução vegetativa, bem como das condições de cultivo e idade da cultura. As formas geralmente encontradas são as esféricas, ovais e elípticas, embora existam certas leveduras com formas altamente características. Entretanto, dizer que uma determinada forma de célula é característica de uma dada espécie ou gênero, não significa que em uma população de leveduras todas as células apresentarão aquela forma, mas pelo menos em um determinado período do desenvolvimento celular as células terão uma forma característica. Assim a forma da levedura não é indício para identificação de espécies e nem a variedade de formas em um mesmo cultivo

pode ser considerado contaminação do mesmo. As leveduras não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Suas dimensões variam consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade, entre outros fatores. Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes e indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA et al., 2002).

2.2 Surfactantes

Os surfactantes são compostos anfipáticos formados por moléculas que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Essas moléculas anfipáticas reduzem a tensão superficial e interfacial através do acúmulo na interface de fluidos imiscíveis, aumentando a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou orgânicos (SINGH et al., 2007). Essas características conferem a esses compostos excelente detergência, emulsificação, formação e estabilização de espumas, etc., fazendo desses produtos um dos mais versáteis em processos químicos (DESAI & BANAT, 1997). A eficácia dos surfactantes é determinada através da capacidade de reduzirem a tensão superficial, que é a medida de energia livre da superfície, por unidade de área necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície. Devido à presença de surfactantes, a tensão superficial é reduzida requerendo menor energia para trazer uma molécula até a superfície. (MULLIGAN, 2005).

2.3. Biosurfactantes

Biosurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas tensoativas (surfactantes) subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Estes produtos possuem propriedades físico-químicas similares às dos surfactantes sintéticos, entretanto oferecem vantagens sobre eles. Entre as vantagens que os biosurfactantes exercem sobre seus similares químicos estão: são compostos

biodegradáveis e não tóxicos ao meio ambiente; podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis; possuem maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade; ocorrem naturalmente no solo, o que os faz aceitáveis sob o ponto de vista ecológico e social (BANAT, et al. 1995; DESAI & BANAT, 1997; KOSARIC, 2001).

Os biossurfactantes são mais eficazes e eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes, e apresentam propriedades que estes não possuem, tais como a maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade. A sua utilização em uma variedade de aplicações devido a suas propriedades e grande versatilidade somada à crescente importância da aceitabilidade ambiental devido a sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade tem aumentado a sua demanda. No entanto, sua entrada no mercado em larga escala ainda está limitada, devido ao seu alto custo de produção quando comparados aos sintéticos (MARQUEZ et al., 2009).

2.3.1 Áreas de aplicação

Uma das áreas de maior aplicação de surfactantes é a indústria petrolífera. Esses produtos são efetivos em reduzir a tensão interfacial entre óleo e água nos poços de petróleo, além de reduzirem sua viscosidade, facilitando sua remoção ou recuperação antes do processamento (LIU et al., 2004). Outra aplicação importante é na biorremediação de sítios contaminados, tornando os poluentes biodisponíveis à sua biodegradação. Na agricultura, surfactantes encontram grande aplicação em controle biológico. Na indústria de alimentos os biotensoativos são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias primas. A emulsificação exerce um importante papel na formação da consistência e texturas exatas, assim como na dispersão de fases creme, manteiga, maionese, molho de saladas, salsichas, sorvetes, entre outros, são exemplos de emulsões em alimentos processados (BANAT et al., 2000). O uso em cosméticos deve-se às suas propriedades umectantes, baixo grau de irritação e compatibilidade com a pele, assim como as propriedades espumantes (MAIER & SOBERÓN-CHAVEZ, 2000).

Estudos comprovando sua atividade antimicrobiana têm aberto novas perspectivas de utilização comercial. Por exemplo, na medicina, pois além de possuírem elevada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, alguns biossurfactantes podem atuar impedindo a fixação de agentes patógenos, tornando sua utilização interessante no tratamento de algumas doenças, atuando como agente terapêutico e probiótico (SINGH & CAMEOTRA 2004).

2.3.2 Classificação e natureza química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes classificam-se segundo sua composição química e origem microbiana. Segundo Desai & Banat (1997), Kitamoto et al. (2002) e Nitschke & Pastore (2002), em sua estrutura anfifílica, a porção hidrofóbica pode ser tanto um ácido graxo de cadeia longa, um ácido graxo hidroxilado ou um α -alquil- β -hidroxilado ácido graxo. A porção hidrofílica, por sua vez, pode ser um carboidrato, um ácido carboxílico, fosfato, aminoácido, peptídeo ou álcool. As principais classes incluem: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

2.3.3 Microrganismos produtores

Esses compostos podem ser sintetizados por bactérias, fungos ou leveduras quando cultivados em meio contendo fonte de carbono hidrocarbonada, como: frações de petróleo e óleos vegetais ou, algumas vezes, fonte de carbono hidrofílica, como açúcares. Na tabela 1 estão representados os principais tipos de biossurfactantes e os microrganismos produtores.

Tabela 1: Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

Tipos de Biossurfactante	Microrganismos
Glicolipídios	
-Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
-Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
-Manosileritritol lipídio(MEL)	<i>Pseudozyma crassa</i> (<i>Candida crassa</i>) <i>P. antarctica</i> (<i>C. antarctica</i>) <i>P. aphidis</i> (<i>C. aphidis</i>) <i>P. graminicola</i> (<i>C. graminicola</i>) <i>P. hubeiensis</i> (<i>C. hubeiensis</i>) <i>P. parantarctica</i> (<i>C. parantarctica</i>) <i>P. rugulosa</i> (<i>C. rugulosa</i>) <i>P. shanxiensis</i> (<i>C. shanxiensis</i>) <i>P. siamensis</i> (<i>C. siamensis</i>) <i>P. tsukubaensis</i> (<i>C. tsukubaensis</i>) <i>Ustiaigo cynodonti</i> <i>Ustiaigo scitaminea</i>
Surfactantes poliméricos	
- Lipopolissacarídeo (Emulsan)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Lipopolissacarídeo (Biodispersan)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Lipopolissacarídeo (Liposan)	<i>Candida lipolytica</i>
-Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Células	Várias bactérias

Fonte: Nitschke & Pastore (2002) e Kitamoto (2009)

2.3.4 Condições de cultivo

A biossíntese de metabólitos secundários como os biossurfactantes geralmente é complexa e mal caracterizada, devido à diversificação de estruturas e ao envolvimento de um amplo espectro de caminhos biossintéticos (MERCADÉ et al., 1997). Embora o mecanismo exato não seja totalmente claro, sabe-se que o papel fisiológico dos biotensoativos está relacionado com o crescimento de microrganismos em substratos imiscíveis em água, através da redução da tensão superficial do meio ao redor, tornando o substrato rapidamente disponível ao metabolismo celular (MAIER & SOBERÓN-CHAVEZ, 2000)

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microorganismos são influenciadas pela natureza das fontes de Carbono e Nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de Fósforo, Ferro, Manganês e Magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (BANAT, 1995). Para obtenção de grande quantidade de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo.

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de Nitrogênio. (FONTES et al., 2008).

A produção e eficiência dos biotensoativos nos meios de cultura é medida através de alguns parâmetros: a redução da tensão superficial entre a fase gasosa e aquosa, a diminuição da tensão interfacial entre as fases aquosa e lipídica, emulsificação e concentração micelar crítica. Os líquidos tendem a adotar uma forma que minimize sua área de superfície, numa tentativa de manter as moléculas com um maior número possível de vizinhos semelhantes. As gotas de líquidos tendem a assumir a forma esférica, pois a esfera é a forma com a menor razão superfície/volume. As forças coesivas entre as moléculas no interior de um

líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. Aquelas da superfície não têm átomos vizinhos acima delas, e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado tensão superficial. A tensão superficial entre as interfaces ar/água e óleo/água podem ser medidas facilmente utilizando-se um tensiômetro (PIRÔLLO, 2006).

A tensão superficial da água pura a 20°C é de 72,8 mN/m, e na presença de um bom tensoativo é de 30 mN/m, aproximadamente. Da mesma forma, a tensão interfacial de um alceno contra a água é de 58,81 mN/m, podendo ser reduzida a valores menores que 1mN/m, na presença de um agente tensoativo (KOSARIC et al., 1983). Um dos índices mais amplamente utilizados para o monitoramento da atividade superficial de compostos tensoativos é a concentração micelar crítica (LIN, 1996), que é a concentração na qual a interface se torna saturada de tensoativo (KOSARIC et al., 1983).

A concentração micelar crítica (CMC) é definida como a solubilidade de um tensoativo na fase aquosa, ou seja, a concentração mínima de tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de micelas. Surfactantes eficientes apresentam baixa concentração micelar crítica, ou seja, menos surfactante é necessário para reduzir a tensão superficial (MULLIGAN, 2005).

A produção de biossurfactantes vem sendo bastante estudada em diversas condições de nutrientes e substratos, os resultados obtidos estão permitindo a obtenção de meios e condições de cultivo que proporcionem melhores qualidades nos produtos obtidos e aumento nas produções.

Casas & Ochoa (1999) estudaram a composição do meio de produção de soforolipídeos por *Candida bombicola*. As fontes de carbono que promoveram maior produção de biossurfactante foram glicose juntamente com óleo de girassol, obtendo-se uma concentração de 120 g/L de biossurfactante após 144 h de fermentação.

Pseudomonas aeruginosa LBI produziram biossurfactantes ramnolipídicos com interessantes propriedades físico-químicas e antimicrobianas quando

cultivadas em resíduos do refino de óleos vegetais (BENINCASA et al., 2004, BENINCASA & ACCORSINI, 2007).

Rodrigues et al. (2006) obtiveram 60-80% de redução do custo de produção de biossurfactantes por *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* quando substituíram o meio sintético por substratos alternativos, como soro de leite e melão.

A produção de biossurfactante por *Acinetobacter calcoaceticus* foi investigada por Rocha et al. (2006) que utilizaram suco de caju como meio de fermentação. O produto, sintetizado a partir dos açúcares redutores, apresentou um índice de emulsão para querosene de 80%.

Sarubbo & Farias (2007) aperfeiçoaram as condições de produção do biossurfactante por *Candida lipolytica* em meio contendo óleo de canola e glicose. O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial de 71 mN/m para valores em torno de 30 mN/m.

Abouseoud et al. (2008) produziram biossurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* em condições de diferentes relações entre as concentrações e fontes de carbono e nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com azeite como fonte de carbono e amônio como fonte de nitrogênio, com uma relação C: N igual a 10. A produção de biossurfactante e o crescimento foram diretamente associados. A tensão superficial foi reduzida para valores abaixo de 32 dinas/cm e com índice de emulsificação de 65% às 48 horas de incubação.

Lima & Contiero (2009) produziram biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 em resíduo de óleo de soja. A cepa foi capaz de reduzir a tensão superficial inicial do meio de 61 mN/m para 32,5 mN /m e produzir uma concentração de 1,96 g/L do produto com índice de emulsificação de 96%.

2.4 Produção de biossurfactantes por leveduras

Apesar da grande parte dos estudos sobre biossurfactantes referirem-se à produção por bactérias, as leveduras e os fungos permanecem como importantes

potenciais produtores que até o momento têm sido objetos de poucos estudos (DELEU & PAQUOT, 2004; AMÉZCUA-VEGA et al., 2007).

Leveduras são conhecidas por produzirem emulsificantes extracelulares quando crescem em substratos imiscíveis em água como n-alcanos ou óleos, de forma a facilitar seu consumo, e também por produzirem biossurfactantes em altas concentrações (FONTES et al., 2008). Dentre elas, espécies de *Candida* têm sido utilizadas amplamente para produzirem tais substâncias quando cultivadas em hidrocarbonetos (SARUBBO et al., 2001).

Kim et al. (2002) produziram o biossurfactante glicolipídico manosileritritol lipídio (Mel), quando cultivaram *Candida* sp. SY 16 em meio mineral contendo óleo de soja como fonte de carbono. O produto obtido apresentou boa capacidade emulsificante contra óleos vegetais e hidrocarbonetos, além de ser estável em pH de 4,0 a 10, e acima de 90°C, foi biodegradado por um lodo ativado obtido de uma calha de esgoto, em curto período de tempo e exibiu toxicidade muito baixa nos fibroplastos de cobaias.

Estudando a produção de glicolipídios por *Candida antarctica* e *Candida apicola* (atualmente *Pseudozyma*), Bednarski et al., (2004) obtiveram uma concentração do produto 7,5 – 8,5 vezes maior quando suplementaram o meio de cultivo com resíduos do refino de óleos vegetais.

Candida bombicola é uma espécie conhecida por produzir soforolipídeos a partir de uma variedade de substratos hidrocarbonados e carboidratos. Estudando a produção de soforolipídeos por essa espécie, quando cultivada em ácidos graxos residuais, Felse et al. (2007) alcançaram uma concentração de 120 g/L em cultivos operando em sistema de batelada alimentada.

Amézcu-Vega et al. (2007) investigaram o efeito das condições de cultivo na produção de biossurfactante por *Candida ingens*, isolada da rizosfera de grama, durante a fitorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os autores observaram que a tensão superficial e os ácidos graxos totais do biossurfactante foram modificados com a variação dos componentes do meio de cultivo.

Ilori et al. (2008) estudaram a produção de biossurfactantes por duas estirpes de leveduras, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Com o objetivo de investigar as habilidades das linhagens para a produção de biossurfactantes e avaliação das propriedades antimicrobianas dos compostos. As linhagens são boas degradadoras de hidrocarbonetos e foram isoladas da água de uma lagoa poluída. Os produtos obtidos apresentaram significativas propriedades antimicrobianas.

Luna et al. (2008) estudaram a produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica*, utilizando-se um planejamento fatorial, para avaliar a influência dos componentes do meio: resíduo de refinaria de óleo vegetal, milhocina e água do mar na redução da tensão superficial. Os menores valores de tensão superficial, aproximadamente 27 mN/m, foram obtidos no ponto central do planejamento (meio contendo 4% do resíduo, 4% de milhocina com 50% de água do mar).

Daverey et al. (2009) estudaram a produção de soforolipídios pela levedura *Candida bombicola* (*Starmerella bombicola*) utilizando substratos fermentativos de baixo custo.

2.5. Isolamento de leveduras produtoras de Biossurfactantes

Geralmente, os microrganismos produtores de biotensoativos são isolados de locais com presença ou contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, pois, na natureza os biossurfactantes exercem um papel fisiológico no aumento da biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas. Além disso, eles estão envolvidos na promoção de adesão celular dos microrganismos e participam nos processos celulares de sinalização e diferenciação, facilitando o consumo das fontes de carbono presentes. (SINGH et al., 2007).

Konish et al. (2008) buscaram a seleção de cepas produtoras de biossurfactantes utilizando um meio seletivo contendo óleo de soja como única fonte carbono e de energia. Foram obtidas 13 estirpes de leveduras com capacidade de produção. Posteriormente, investigaram as estruturas moleculares, os perfis de produção e também classificaram provisoriamente as leveduras

isoladas de acordo com a análise molecular e filogenética como pertencentes ao gênero *Pseudozyma*.

Katamai et al. (2008) isolaram de solos contaminados leveduras com capacidade de produção de biossurfactantes. Foram obtidos 237 isolados, dos quais 81 foram pré-selecionadas como produtoras de substâncias tensoativas, sendo que ao final somente 5 estirpes alcançaram produção satisfatória de glicolipídios.

2.5.1 Fontes de carbono utilizadas para a produção de biossurfactantes por leveduras.

Apesar das vantagens que apresentam sobre os surfactantes químicos, os biossurfactantes ainda encontram uma importante restrição com relação a sua aplicação industrial pelo custo de produção ser superior ao dos quimicamente sintetizados, devido a sua baixa produtividade e o uso de substratos onerosos para a sua obtenção (DE LIMA et al., 2009).

A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono utilizadas para a produção de biossurfactantes por leveduras nos últimos 30 anos. Pareilleux et al. (1979) isolaram compostos tensoativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo *n*-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose, a levedura não apresentou resultados positivos. Em estudos similares, Kim & Rehm (1982) e Cirigliano & Carmam (1984) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono, tais como: hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão. Sendo que com hexadecano houve maior produção de biossurfactante.

Em 2001, Sarubbo et al. produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica* IA 1055, o qual apresentou uma alta atividade de emulsificação. Amaral et al. (2006) utilizaram também a glicose como fonte de carbono para a síntese do biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Yansan apresentou alta atividade de emulsificação e capacidade de estabilização de emulsões óleo/água.

Adicionalmente, meios de cultura contendo lactose como substrato foram utilizados para a produção de manoproteínas, com propriedades emulsificantes, pela levedura *K. marxianus*. Em 2009 Hirata et al., descreveram a produção de um biossurfactante soforolipídico, utilizando óleo de soja e glicose como fonte de carbono. O microrganismo utilizado foi a *Candida bombicola*. Por ser uma espécie não patogênica, o produto obtido foi utilizado em estudos medicinais.

Portanto, nas ultimas três décadas, vários trabalhos foram publicados envolvendo a produção de biossurfactantes por leveduras em fontes de carbono convencionais. Contudo, todos esbarraram sempre no problema do alto custo de produção para que sua fabricação em larga escala fosse viabilizada.

Uma possível estratégia para reduzir os custos de produção é o uso de substratos alternativos, como os resíduos agrícolas ou da indústria de alimentos que geralmente contém altos níveis de carboidratos e lipídios necessários para a biossíntese de biossurfactantes. Alguns exemplos de substratos alternativos são: óleos utilizados, *soapstock* (resíduo sólido da refinação de óleos vegetais), resíduos do processamento de batata, mandioca, melaço de cana e atualmente o glicerol resíduo da produção de biodiesel (DE LIMA et al. 2009).

A preocupação com o meio ambiente vem mobilizando alguns segmentos de mercado. Diversos setores governamentais e industriais vêm se preparando para aplicar políticas ambientais que visem à diminuição dos impactos negativos na natureza. Os resíduos agroindustriais constituem-se numa potencial fonte de impacto ambiental além de necessitarem de grandes investimentos em tratamentos de controle de poluição, representam perdas significativas de matéria prima e energia. Alguns resíduos em especial são responsáveis por grande preocupação com relação a sua disposição.

A necessidade de se buscar fontes alternativas de combustível para substituir os veículos dependentes de petróleo levou o Brasil a uma importante posição no cenário da produção de etanol a partir da cana de açúcar. Entre 2000/2007, foram produzidos 17 milhões de m³ de etanol. O estado de São Paulo é responsável por 80% dessa produção. No processo de produção do etanol são produzidos 10 L de vinhaça por cada litro de produto. Nesse sentido, apenas no

estado de São Paulo, no mesmo período foram produzidos 136 milhões de m³ de vinhaça. Apesar da utilização desse resíduo na irrigação de culturas e para a produção de biogás, grandes volumes ainda constituem-se em um importante problema ambiental da indústria de etanol. Outra indústria de bicomcombustíveis que recentemente vem se expandindo com as políticas ambientais é a do biodiesel, que irá gerar milhões de toneladas de glicerol como resíduo, apesar de sua ampla utilização, o mercado não absorverá toda a produção. O processo produtivo gera em média, para cada 10 kg de biodiesel, 1 kg de glicerol (FONTES et al. 2008).

De forma similar, a indústria de óleos vegetais gera quantidades significativas de resíduos durante o processo de refino. No Brasil, cinco milhões de toneladas de óleo de soja foram produzidas em 2004 de acordo com a Associação brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais. A produção de *soapstock* – borra do refino, corresponde a 2-3% do volume total. Mesmo o óleo vegetal já utilizado é um resíduo muito preocupante, pois segundo Castellaneli et al. (2007), o resíduo do óleo de cozinha, gerado diariamente nos lares, indústrias e estabelecimentos do Brasil, devido à falta de informação da população, acaba sendo despejado diretamente nas águas, como em rios e riachos ou simplesmente em pias e vasos sanitários, indo parar nos sistemas de esgoto causando danos como entupimento dos canos e o encarecimento dos processos das estações de tratamento. Adicionalmente acarreta a poluição do meio aquático, ou ainda, do lixo doméstico – contribuindo para o aumento das áreas dos aterros sanitários.

A produção mundial de óleos e gorduras – 75% derivados de plantas – é de 2,5 a 3 milhões por ano, sendo a maioria usada na indústria alimentícia, responsável por grandes quantidades de resíduos graxos de extração das sementes oleaginosas. O acúmulo desses resíduos tem aumentado a utilização desses materiais para a transformação microbiana (LUNA et al. 2008).

Uma alternativa interessante seria gerar, a partir destes resíduos, produtos de valor comercial ao invés de investir apenas em tratamento para sua disposição final. Para Morita et al. (2007) a transformação industrial dos recursos renováveis, ou seja, materiais de origem natural, em compostos úteis, tem recebido muita atenção do ponto de vista ambiental. Os recursos atualmente disponíveis são:

óleo, amido, açúcar, celulose e lignocelulose a partir de plantas, e uma variedade de resíduos orgânicos provenientes da agricultura e indústrias relacionadas.

Diversos resíduos agroindustriais têm sido estudados como potenciais substratos para produção de biossurfactantes (BENINCASA & ACCORSINI 2007; FELSE et al. 2007). Bednarski et al. (2004) utilizando linhagens de *Candida antarctica* e *Candida apicola* pesquisou qual era a influência da adição de *soapstock* em um meio fermentativo para a produção de biossurfactantes e observou um aumento na produção de até oito vezes nos meios suplementados com esse resíduo. Morita et al. (2007) utilizaram glicerol na produção de glicolipídeos pela levedura *Pseudozyma antarctica*, obtendo resultados muito satisfatórios. O glicerol é utilizado com sucesso como carbono solúvel em água para diferentes produções microbiana. Para a viabilidade da produção de biomatérias, é necessária a substituição por glicerol das fontes de carbono convencionais como óleos, n-alcenos e glicose. Muitos estudos vêm sendo realizados com fontes de carbono alternativas e os resultados obtidos são favoráveis à produção de biossurfactantes por leveduras em grande escala.

A redução dos custos de produção ainda requer um aumento na eficiência de biossíntese e a seleção de substratos de baixo custo. Uma vez que estes são responsáveis por 10-30% do custo de produção total (RODRIGUES et al., 2006). Corroborando com o que foi exposto previamente, a utilização de resíduos agroindustriais pode se constituir em uma estratégia que associa a redução dos custos de produção de biossurfactantes, tornando-os economicamente competitivos, com a minimização de despejos no meio ambiente. Considerando-se que os campos de aplicação de biossurfactantes são extremamente amplos e que há a necessidade de sua obtenção através de processos economicamente competitivos, é possível constatar que a utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa altamente promissora. Ao se empregar tais substratos em processos para obtenção de produtos de alto valor agregado, não apenas serão reduzidos os custos de produção como também o volume de rejeitos que deverão ser dispostos no meio ambiente ou investimentos em energia para o seu tratamento. Entre os resíduos com grande potencial para serem utilizados como

substrato, destacam-se os resíduos do refino de óleos vegetais e os resíduos da síntese de biocombustíveis.

3 .OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principais objetivos:

- 1) Isolar leveduras de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo;
- 2) Verificar a capacidade de produção de biossurfactantes pelos isolados em fontes de carbono convencionais;
- 3) Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes sob cultivo em resíduos agroindustriais como substrato, com ênfase nos resíduos das indústrias de óleos vegetais e biocombustíveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e análises do solo

4.1.1 Coleta do solo

As amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo foram obtidas em rejeito de óleo lubrificante de uma oficina mecânica de caminhões na cidade de Jaboticabal- SP. O solo foi coletado da superfície do local e acondicionado em recipientes estéreis e levado rapidamente ao laboratório. Desse solo uma alíquota foi separada para a obtenção do extrato orgânico total para a obtenção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (T.P.H.) presentes. Outras duas foram encaminhadas para a extração do inóculo original e para análise das características físico-químicas do solo.

4.1.2 Extração dos hidrocarbonetos totais de petróleo presentes na amostra

O E.O.T. (EXTRATO ORGÂNICO TOTAL) do solo foi obtido através de extração em *Soxhlet*. Foram pesados 10 g do solo contaminado, enrolado em papel de filtro e inserido no cartucho de extração. Como solventes foram utilizados acetona e diclorometano 120:120 mL. Os extratores ficaram ligados por 12 horas. Após a extração, o extrato obtido foi filtrado em NaSO₄, concentrado em evaporador rotativo, recuperado com diclorometano e pesado em tubos do tipo “viales”, obtendo-se assim o E.O.T. por pesagem.

A partir do E.O.T., foram determinados os Hidrocarbonetos Totais de Petróleo mediante fracionamento em coluna de alumina segundo o protocolo EPA 3611b. Para tanto foram utilizadas colunas de vidro (30 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro) contendo 10 g de alumina (70-230 mesh) desativada com 5% de água deionizada. A alumina foi empacotada na coluna com 50 mL de diclorometano, e adicionou-se aproximadamente 1 cm de Na₂SO₄. Após o empacotamento a coluna foi eluída com 60 mL de hexano. As frações de T.P.H. foram obtidas a partir da eluição do E.O.T. com 15 mL de hexano para as frações aromáticas coletadas em balões, em seguida adicionou-se 100 mL de diclorometano para se obter as frações alifáticas também coletadas em balões e por fim adicionou-se 100 mL de metanol para se obter as frações polares. Finalmente o extrato T.P.H. foi concentrado em evaporador rotativo e determinado por pesagem.

4.1.3 Análises físicas e químicas do solo

As análises físicas e químicas do solo foram realizadas pelo laboratório de solo e sacarose da Copercana em Sertãozinho-SP. A metodologia utilizada para a análise física foi baseada no Método do Densímetro, conhecida também como método do hidrômetro, proposto em 1926 por Bouyoucos. As análises químicas do solo visaram a determinação do pH em cloreto de cálcio, quantificação da matéria orgânica, fósforo, potássio, cálcio, sódio, magnésio e alumínio. As metodologias utilizadas foram realizadas segundo Rajj et al., (2005).

4.2 Obtenção do inóculo original

O inóculo original foi obtido a partir de 1 g de solo que foi adicionado a 50 mL de meio mineral B.H.B (Bushnell-Haas Broth) + Extrato de Levedura estéril composto por (g/L): MgSO₄, 0,2; KH₂PO₄, 1,0; CaCl₂, 0,02; (NH₄)₂HPO₄, 1; KNO₃, 1; FeCl₃, 0,05 e extrato de levedura 2,0. O frasco foi mantido em mesa agitadora por 24 horas à temperatura de 30°C e 150 rpm. Após o período de incubação a suspensão ficou em repouso por 1 hora. Dessa suspensão foi retirado 1 mL e

adicionado ao meio de cultivo utilizado para o enriquecimento descrito por Chen et al. (2006) composto por: extrato de levedura, 0.2 % (p/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4% (p/v); KH_2PO_4 , 0.1% (p/v); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1% (p/v) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% (p/v). A esse meio foram adicionados óleo de soja 2% (v/v) e 50 μL de ampicilina 0,25 mg. O meio enriquecido com a fonte de carbono e a suspensão celular foi incubado em mesa agitadora com temperatura a 30°C e 160 rpm, a cada 7 dias esse consórcio era enriquecido com a fonte de carbono em um novo meio, retirava-se 500 μL do cultivo envelhecido e adicionava ao novo. Alíquotas desses enriquecimentos eram congeladas e armazenadas em criotubos com glicerol para evitar eventuais perdas.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para o preparo das amostras observadas à microscopia eletrônica de varredura, no Setor de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal - UNESP, as leveduras foram isoladas diretamente do consórcio. Foram retirados 30 mL e centrifugadas a 1699 x g por 20 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado sendo utilizado o pellet, que foi concentrado em 2 mL de Ringer (solução salina composta por :NaCl 9 g/L estéril) em tubos eppendorf e centrifugados por 10 min. Os precipitados das leveduras foram imersos em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato pH 7,4 a 0,1 M, onde permaneceram por 48 horas, sendo logo após, lavados em solução tampão fosfato pH 7,4 a 0,1 M e imersos em tetróxido de ósmio a 1% por quatro horas. Na seqüência, estas amostras foram lavadas novamente em solução tampão fosfato pH 7,4 a 0,1 M, seguindo para o protocolo de desidratação, que consiste na imersão dos precipitados em série de concentração crescente de álcool (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%), por 20 minutos em cada diluição. Para a desidratação total, o material foi levado ao aparelho de secagem de ponto crítico por um período de 30 minutos.

Após a secagem ocorreu a metalização em banho de ouro, realizada no equipamento DESK II (Denton vacuun), por 120 segundos, e em seguida as

amostras foram elétron fotomicrografadas em um Scanning Microscope JSM 5410 da marca Jeol®, para a documentação e análise.

4.4 Isolamento das leveduras

Após o 20º enriquecimento foram realizadas diluições até 10^{-6} em solução salina (NaCl 0,9 %), a partir desta solução foi realizado o plaqueamento em um meio para diferenciação morfológica descrito por Van der Valt & Yarron (1984) composto por glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, extrato de levedura 0,5 g/L e Agar 1,7 g/L, para cada 100 mL adicionava-se 1 mL de ampicilina ao meio já esterilizado e a temperatura ambiente. Foi adicionado 0,1 mL de inóculo de cada diluição às placas em duplicata que em seguida foram incubadas em estufa a 30°C por até 72 horas. A partir das placas inoculadas foram isoladas leveduras por diferenciação morfológica, levando-se em conta fatores como cor, borda, tamanho das colônias, textura, superfície e elevação. Esses isolados foram transferidos para três diferentes meios. 1º) Agar Sabouraud; 2º) GYMP, descrito por Lodder (1970), composto por glicose 20 g/L, extrato de malte 1 g/L, extrato de levedura 0,5 g/L, fosfato de sódio monobásico 0,20 g/L e Agar 1,7 g/L; 3º) mesmo meio utilizado para diferenciação morfológica. As leveduras foram, então re-cultivadas no meio GYMP, meio o qual se obteve os maiores crescimentos, a cada 15 dias.

4.5. Caracterização dos isolados

4.5.1 Caracterização dos isolados em meio cromogênico CHROMagar™ Cândida

O CHROMagar™ Candida (Microbiology, França) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados lentamente 4,8 gramas do meio desidratado a 100 mL de água destilada em um misturador até a completa hidratação do agar. Em seguida levado ao forno de microondas e aquecido por intervalos de tempo consecutivos sem permitir a ebulição, a cada intervalo o meio

era agitado lentamente, o aquecimento ocorreu até a completa fusão do agar que foi resfriado em banho-maria a 45°C e distribuído em placas de Petri.

Cada isolado foi subcultivado neste meio e incubado a 30°C por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias (GARCIA-MATOS et al., 1998)

4.6. Ensaio para verificação da capacidade de produção de biossurfactantes.

4.6.1 Preparo do inóculo

O pré-inóculo foi preparado sob condições e meio de cultivo descritos por Kitamoto (1990), em erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de água destilada, KH_2PO_4 3 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaNO_3 30 g/L e MgSO_4 3 g/L e 4% de glicose como fonte de carbono. O meio foi esterilizado em autoclave, primeiramente com a água, e a fonte de carbono, sendo os sais esterilizados separadamente em soluções trabalho e adicionados em seguida ao meio para evitar a precipitação dos mesmos. As leveduras foram coletadas assepticamente com alça de platina e transferidas para uma solução contendo 10 mL de solução Ringer, dessa suspensão 5 mL foram transferidos ao meio, o qual foi incubado em mesa agitadora a 200 r.p.m, a uma temperatura de 30°C por 48 horas.

4.6.2 Meios de cultivo com fonte de carbono convencional

Os ensaios utilizando fontes de carbono convencionais foram realizados sob condições e meio de cultivo descritos por Kitamoto (1990), em erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de água destilada, KH_2PO_4 2 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaNO_3 20 g/L e MgSO_4 2 g/L e 4% de fonte de carbono convencional, sendo elas: óleo de soja, petróleo (gentilmente cedido pela Petróbras), glicose e óleo diesel. O meio foi esterilizado em autoclave, primeiramente com a água e a fonte de carbono, sendo os sais esterilizados separadamente em soluções

trabalho e adicionados em seguida ao meio para evitar a precipitação dos mesmos. Foram adicionados 5% de inóculo ao meio, o qual foi incubado 200 r.p.m, a uma temperatura de 30°C por 7 dias.

4.6.3 Meios de cultivo com fonte de carbono alternativa

Para os ensaios utilizando fonte de carbono alternativa foi utilizado o mesmo meio de cultivo descrito por Kitamoto (1990) no item 4.6.2, sob as mesmas condições de cultivo variando-se as fontes de carbono, que foram: o *soapstock* (resíduo da produção de óleo de soja, fornecido gentilmente pela Cargil-Mayrincque) sob duas condições iniciais de p.H 6 e 9, glicerol comercial marca Sinth® e óleo de soja queimado (resíduo de fritura de uma pastelaria situada na cidade de Sertãozinho SP).

4.6.4 Meios de cultivo com mistura de fonte de carbono convencional e alternativa

Foi utilizado o mesmo meio descrito por Kitamoto, (1990), sob as mesmas condições de cultivo. As fontes de carbono utilizadas foram as seguintes: glicose 2% e *soapstock* 4% e glicose 4% e *soapstock* 10%. Foram realizados experimentos nos quais a água era substituída por vinhaça, resíduo da produção de etanol, retirada diretamente da coluna de destilação e fornecida gentilmente pela Usina São Francisco na cidade de Sertãozinho.

4.6.5 Métodos analíticos para os bioprocessos

Amostras do meio foram retiradas antes da adição do inóculo. Após a inoculação, as alíquotas eram coletadas em intervalos de 24 horas para a avaliação dos parâmetros de cultivo, sendo submetidas a análises de pH, tensão superficial e biomassa seca.

Foram coletados assepticamente 10 mL do meio, centrifugados a 1699 x g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para a avaliação do pH e tensões superficiais. Os sedimentos contendo as células foram utilizados para avaliação da biomassa seca.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e o resultado apresentado representa a média aritmética dos resultados obtidos.

4.6.6 Determinação da tensão superficial

O monitoramento da produção de biossurfactantes foi realizado medindo-se a tensão superficial dos meios, segundo o método do anel de De Nöuy, utilizando-se um tensiômetro KRÜSS K6 (ROBERT et al. 1989).

4.6.7 Determinação da Biomassa seca

O crescimento celular foi avaliado através da quantificação da biomassa seca. O resíduo celular foi ressuspendido em 10 mL de água destilada e centrifugado sob os mesmos parâmetros já descritos acima. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 mL de acetato de etila ao resíduo celular, realizando nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram transferidas para recipientes previamente pesados. Em seguida secos em estufas a 100° C e novamente pesados, obtendo-se a biomassa seca.

4.6.8 Extração e quantificação dos biossurfactantes obtidos

Os produtos obtidos foram extraídos segundo Jing et al. (2007) e Kitamoto et al. (2001), utilizando-se acetato de etila em mesmo volume e evaporados a vácuo a 50°C para retirar o solvente. Em seguida foram lavados com hexano e novamente evaporados a 50°C em bomba de vácuo, obtendo-se os extratos que foram quantificados por pesagem.

4.6.9 Análise da atividade surfactante dos produtos obtidos

Para avaliar a eficiência dos produtos obtidos em reduzirem a tensão superficial foram adicionadas alíquotas de até 0,02 g dos produtos extraídos dos

meios de cultura e purificados, concentração a qual ocorreu à máxima redução da tensão superficial, a 20 ml de água ultra-pura. A avaliação foi realizada a cada 24 horas seguindo até o final das 168 horas de cultivo.

4.7. Análise Físico-química da vinhaça

A análise química da vinhaça foi realizada pelo laboratório de solo e sacarose da Copercana em Sertãozinho-SP. A vinhaça foi cedida gentilmente pela usina Santo Antonio de Sertãozinho-SP.

A amostra foi coletada e levada ao laboratório para as análises de: Nitrogênio (N), Fósforo Total (P_2O_5), Potássio total (K_2O), Matéria orgânica (M.O), Oxido Cálcio ($CaCO_2$) e Oxido Magnésio (MgO) (MAPA, coordenação-geral de apoio laboratorial, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características do solo

5.1.1 Análises físico - química do solo

Através das análises físico-químicas do solo do qual se extraiu os microrganismos isolados verificou-se pH em torno de 6,1, Matéria orgânica 53 g/dm³, Fósforo 28 mg/dm³, Potássio 1 mmol/dm³, Cálcio 107 mmol/dm³, Magnésio 11 mmol/dm³, Alumínio 15 mmol/dm³ e era composto por 18,60% de Argila, 7,80% de Silte, 64,20% de Areia grossa e 19,40% de Areia fina, sendo classificado texturalmente como solo Franco Arenoso. Esses tipos de solos segundo Reinert & Reichert (2006), são menos porosos, possuem maior macroporosidade, possuem baixa retenção de água, boa drenagem e aeração, são menos densos, aquecem rapidamente, são resistentes a compactação, possuem baixa CTC (Capacidade de troca catiônica), são mais lixiviáveis, são mais suscetíveis a erosão, possuem baixa coesão são friáveis, sua consistência quando úmido é friável e possuem pouca matéria orgânica com rápida decomposição, o que acarreta uma baixa densidade microbiana em comparação aos outros tipos de solos.

Segundo Moreira & Siqueira (2006), os microrganismos têm versatilidade para adaptações a mudanças ambientais; por isso, são encontrados em todos os tipos de solo, havendo uma ligação muito grande entre microrganismos, estrutura e matéria orgânica desse ambiente. A diversidade e quantidade de microrganismos variam entre diferentes tipos de solo segundo diversos

parâmetros como oxigenação, matéria orgânica, nutrientes, umidade e etc. Portanto, o tipo de solo age seletivamente sobre os tipos de microrganismos presentes, porém é difícil estipular quais espécies de microrganismos seriam encontradas em determinado tipo de solo. Através dos resultados obtidos nas análises físico-químicas do solo pode-se concluir do ponto de vista microbiológico que este tipo de solo apresenta baixa densidade microbiana, e pode selecionar microrganismos de maior dimensão, como as leveduras.

5.1.2 Hidrocarbonetos totais presentes na amostra

A extração do T.P.H do solo indicou sua presença em 74.112 mg/kg de solo, sendo 49.830 mg/kg referente às frações alifáticas, 6.770 mg/kg às aromáticas e 1.440 mg/kg de poliaromáticas. As quantidades encontradas estão acima dos valores orientados, permitidos e ou tolerados por lei. Os teores dos hidrocarbonetos nas amostras de solo, neste trabalho, tiveram como referência os “Valores Orientadores para Solo e Água subterrânea no Estado de São Paulo” da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), referente ao artigo 1º da Decisão de Diretoria no 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005.

5.2. Análise química da vinhaça

Pela análise química da vinhaça pode-se observar os seguintes resultados para os elementos analisados: Nitrogênio (N) 0,47Kg/m³, Fósforo total (P₂O₅) 0,18 Kg/m³, Potássio total (K₂O) 4,47 Kg/m³, Matéria Orgânica 12,33 Kg/m³, Óxido de Cálcio (CaCO₂) 1,17Kg/m³, Óxido de Magnésio (MgO) 0,28 Kg/m³ e A.R.T (açúcares redutores totais) 0,617 kg/m³. Os resultados estão expressos em Kg/m³ por convenção.

5.3. Isolamento das leveduras do solo contaminado

5.3.1 Obtenção do consórcio de leveduras

A extração dos microrganismos do solo levou à obtenção de um consórcio de leveduras. Após 15 subcultivos, em óleo de soja como substrato, foi retirado o inóculo original do qual foram extraídos os isolados.

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 1 corresponde à micrografia obtida a partir do 5º enriquecimento do inóculo original utilizando óleo de soja como fonte de carbono. Ao analisar a imagem evidencia-se a presença de leveduras (Células ovais maiores indicadas pela seta “A”), porém foi observado o predomínio de bactérias (Células numerosas e menores indicadas pela seta “B”). Após a constatação da presença de bactérias decidiu-se pela utilização de uma substância com ação antibiótica para reduzir a presença desses procariotos. Ao término do 10º subcultivo na presença do antibiótico verificou-se em microscópio eletrônico a redução ou extinção da população de bactérias no meio de enriquecimento.

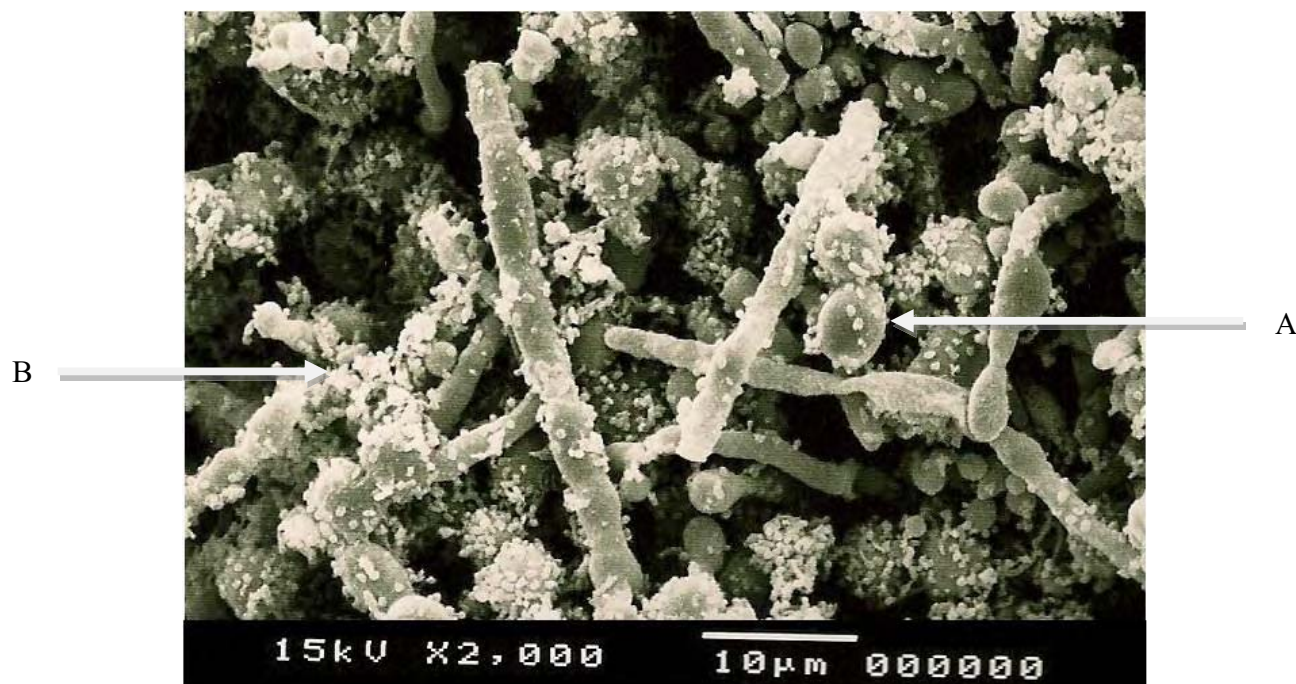


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura do 5º subcultivo enriquecido em óleo de soja com aumento de 2000 vezes. Com destaque para “A” leveduras e “B” bactérias.

5.3.3 Isolamento das leveduras

A inoculação em meio sólido de diferenciação morfológica, levou a obtenção de cerca 40 microrganismos, dos quais, sete apresentaram diferenças morfológicas e características (tamanho de colônia, coloração, textura, superfície e bordo) que possibilitaram a diferenciação e posterior separação como sendo isolados diferentes. Os sete isolados obtidos foram inicialmente designados como LBPF 1, LBPF 3 LBPF 7, LBPF 9, LBPF 10, LBPF 14 e LBPF 15, essas características morfológicas são descritas na Tabela 2. Os nomes LBPF fazem referência ao Laboratório de Biorremediação e Processos Fermentativos, local onde foi realizado o isolamento das leveduras.

Tabela 2: Aspectos morfológicos das colônias apresentados pelos isolados em meio sólido, a 30°C e as 48 horas de incubação.

Leveduras	Características morfológicas após 48 horas de crescimento em meio sólido.					
	Tamanho	Textura	Cor	Superfície	Bordo	Elevação
LBPF 1	3-5 mm	Brilhante	Creme	Lisa	Liso	Convexa
LBPF 3	1-4 mm	Viscosa	Creme	Lisa	Liso	Convexa
LBPF 7	NM*	Fosca	Branco	Complexa	Ondulado	Plana
LBPF 9	5-7 mm	Fosca	Branca	Crespa	Denteado	Elevada
LBPF 10	3-7 mm	Brilhante	Amarela	Lisa	Liso	Lisa
LBPF 14	10 mm	Brilhante	Creme	Lisa	Liso	Plana
LBPF 15	1-4 mm	Brilhante	Creme	Lisa	Liso	Convexa

NM= não mensurado.

Observou-se que houve uma pequena variação quanto ao tamanho da colônia em um mesmo isolado. Os isolados LBPF 1, LBPF 3, LBPF 10, LBPF 14 e LBPF 15 apresentaram superfície e bordo lisos. Os isolados LBPF 7 e LBPF 9 apresentaram as características de superfície complexa e crespa de bordo, ondulado e denteado respectivamente. Convém citar que quanto ao aspecto coloração, alguns isolados coloridos apresentaram uma evolução na coloração com o passar do tempo até chegar a uma cor final, fato observado quando o isolado foi transferido do meio de diferenciação para o meio de armazenamento e reativação. Por exemplo, LBPF 10 que apresentava coloração amarela evoluiu para a cor branca. Suspeitou-se que a mudança de cor seria proveniente de contaminações, assim sendo repetiram-se os testes e os mesmos evoluíram da cor branca para amarela, contrariando as suspeitas. Guidi (2000), ao isolar leveduras contaminantes do inóculo da fermentação alcoólica observou fato semelhante, algumas de suas estirpes ao mudar de meio mudavam também a coloração, foram refeitos os testes e comprovou-se que a mudança era influenciada pelo meio.

De acordo com as características morfológicas apresentadas pelas leveduras, quando em meio sólido, verificou-se que sob este aspecto os isolados

são diferentes. Porém, o meio sólido não é utilizado com finalidade de classificação, apenas como critério de diferenciação visual entre os isolados. As Figuras de 2 a 8 representam os isolados inoculados em meio sólido de diferenciação.



Figura 2: Isolado LBPF 1, cultivado em meio sólido.



Figura 3: Isolado LBPF 3 , cultivado em meio sólido.



Figura 4: Isolado LBPF 7 , cultivado em meio sólido.



Figura 5: Isolado LBPF 9 , cultivado em meio sólido.



Figura 6: Isolado LBPF 10 , cultivado em meio sólido.



Figura 7: Isolado LBPF 14 , cultivado em meio sólido.



Figura 8: Isolado LBPF 15 , cultivado em meio sólido.

Os resultados obtidos pela análise de crescimento celular em diferentes meios sólidos são apresentados na Tabela 3. Verificou-se que todos os isolados apresentaram um maior crescimento no meio GYMP, após um período de 48 horas de incubação já se observava o desenvolvimento celular nas diluições empregadas (10^{-6} / 10^{-8}). A primeira contagem foi realizada após 24 horas e prosseguiu até o sétimo dia, porém, em todos os casos o número de leveduras não variou muito a partir das 48 horas.

Tabela 3: Contagem de leveduras em diferentes meios. Número de UFC/mL, incubadas a 30°C, nos meios GYMP, YEPD e Agar Saboraud com Clorofenicol, às 48 horas de incubação.

Leveduras	Meios de cultura		
	GYMP	YEPD	Agar Saboraud
LBPF 1	35×10^8	7×10^8	1×10^8
LBPF 3	38×10^8	6×10^8	2×10^8
LBPF 7	178×10^8	134×10^8	11×10^8
LBPF 9	235×10^8	98×10^8	15×10^8
LBPF 10	9×10^8	5×10^8	3×10^8
LBPF 14	115×10^8	42×10^8	25×10^8
LBPF 15	22×10^8	3×10^8	1×10^8

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que o meio GYMP, atendeu aos propósitos de quantificação e quesitos fisiológicos, para verificação de crescimento e desenvolvimento celular, sendo ele escolhido para ser utilizado durante todo o trabalho.

5. 4. Caracterização dos isolados

5.4.1 Caracterização dos isolados através do meio cromogênico CHROMagar™ Candida

Os resultados obtidos através do plaqueamento em meio cromogênico CHROMagar™ Candida possibilitaram além da diferenciação dos isolados a caracterização presuntiva a nível de espécie. Os isolados LBPF 1, LBPF 3 e LBPF 15, foram caracterizados como *Candida tropicalis*, pois apresentaram coloração azul após 48 horas de incubação neste meio. O isolado LBPF 7 foi caracterizado como *Candida albicans* apresentando coloração verde metálica. O isolado LBPF 10 foi caracterizado com *Candida glabrata*, apresentando coloração lilás. Os isolados LBPF 9 e LBPF 14 não apresentaram crescimento nos meios, mesmo após 96 horas de incubação, portanto não foi possível caracterizá-los, mas deduz-se que podem não pertencer ao gênero *Candida*. As Figuras de 9 a 13 correspondem aos isolados inoculados nos meios cromogênicos.

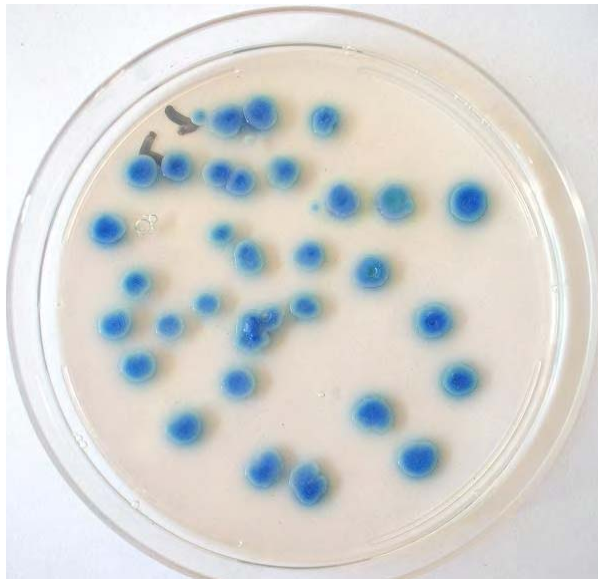


Figura 9: Isolado LBPF 1, crescido em meio sólido cromogênico às 48 horas de incubação.

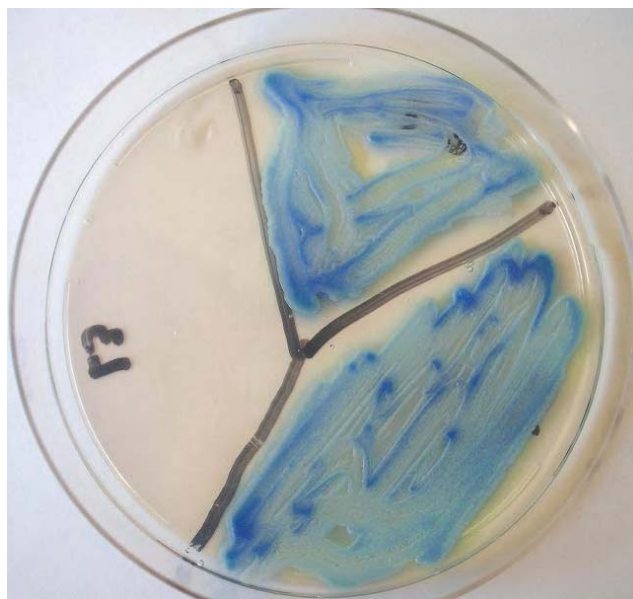


Figura 10: Isolado LBPF 3, crescido em meio sólido cromogênico às 48 horas de incubação.



Figura 11: Isolado LBPF 7, crescido em meio sólido cromogênico às 48 horas de incubação

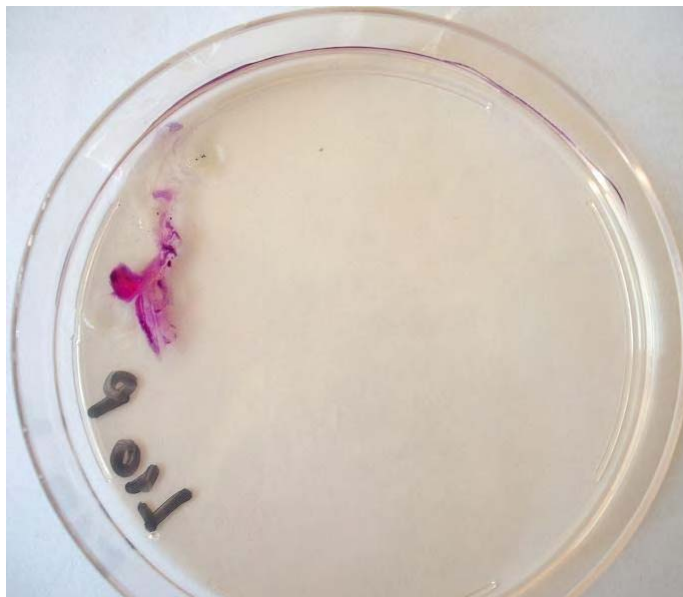


Figura 12: Isolado LBPF 10, crescido em meio sólido cromogênico às 48 horas de incubação

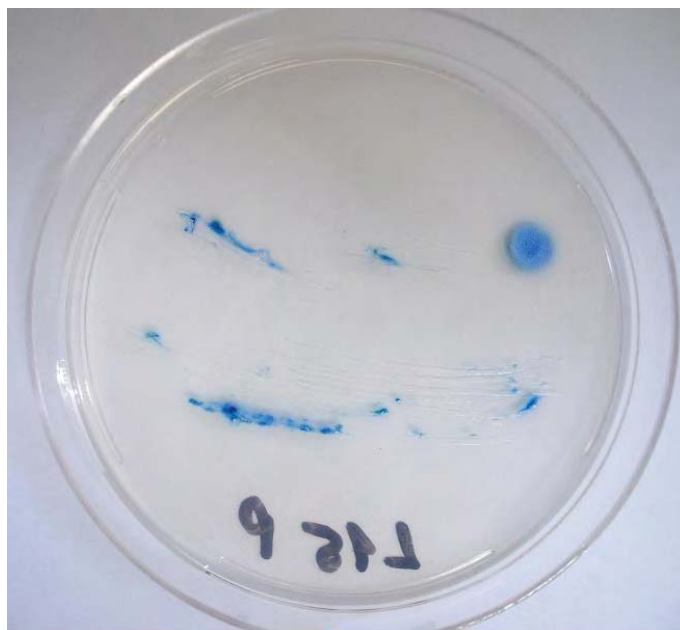


Figura 13: Isolado LBPF 15, crescido em meio sólido cromogênico às 48 horas de incubação

CHROMagar™ Cândida é um meio cromógeno que permite a identificação presuntiva das leveduras por conter vários substratos enzimáticos que hidrolizados pelas hexoaminidases correspondentes, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia em um tempo de 24 a 48 horas (QUINDÓS et al., 2001). O meio utilizado indica colônias verde-metálicas para *C. albicans*, azuis para *C. tropicalis*, lilás para *C. glabrata* e coloração branca para as demais espécies do gênero *Candida* (ODDS & BERNAERTS 1995). Diversos autores verificaram a eficiência do meio para identificação das espécies de *Candida* quando comparados aos métodos tradicionais, bioquímicos e moleculares. Yucesoy & Marol (2003) verificaram que de 169 isolados de *C. albicans*, 168 apresentaram colônias verdes claras em CHROMagar™ Cândida, de 33 isolados de *C. tropicalis* estudados, 32 mostraram colônias de cor azul. Araujo et al. (2005) verificaram 100% de concordância para os isolados de *C. glabrata*, que apresentaram coloração lilás.

Os resultados obtidos através da caracterização dos isolados evidenciaram a predominância do gênero *Candida*, atualmente chamado de *Pseudozyma*. Essas

leveduras são fungos basidiomicetos, que podem possuir a capacidade de produzirem biossurfactantes (Morita et al, 2007). Segundo Fontes et al., (2008), as leveduras têm sido estudadas para a produção de emulsificadores, entre elas espécies de *Candida* e *Yarrowia*, são empregadas na produção de biossurfactantes com grande sucesso. Espécies de *Candida* tem sido amplamente utilizadas para a fermentação de substratos insolúveis e freqüentemente relatadas para a produção de agentes emulsificantes (RUFINO et al. 2007). Sarubbo et al. (2006) demonstraram a produção de um biossurfactante produzido por *Candida glabrata*, quando cultivada em um n-Hexadecano. Kim et al. (2006) isolou vinte colônias de leveduras formadoras de halos em placas de ágar cobertas de óleo cru em amostras de solo contaminado. As colônias isoladas foram cultivadas no líquido de isolamento contendo n-Hexadecano, óleo de soja ou glicose como fonte de carbono e verificou-se a produção de biossurfactante. A maioria das estirpes foi identificada como sendo do gênero *Cândida*. Konish et al. (2008), utilizando *Candida batistae* estudaram a produção de glicolipídeos em meios alternativos. Hirata et al. (2009) estudaram a produção de biossurfactantes soforolipídicos em meios de baixo custo pela levedura não patogênica *Candida bombicola*.

A grande variedade de espécies dentro do gênero influencia também o tipo de biossurfactante obtido, por exemplo: *Candida bombicola*, *Candida petrophilum* e *Candida bogoriensis* foram relatadas como produtoras de Soforolipídeos, *Candida antarctica* foi relatada como produtora de manosileritritol-lipídeos, *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica* IA 1055, foram citadas como produtoras de Complexo carboidrato- proteína-lipídeo e várias outras espécies como *Candida ingens*, *Candida utilis*, *Candida valida* e *Candida boleticola* com a produção de biossurfactantes não classificados (ILORI et al. 2008).

A gama de espécies de leveduras dentro do gênero *Candida* abrange um amplo leque de produtos que podem vir a ser produzidos. Esses microrganismos além de serem facilmente isolados, apresentam uma grande versatilidade para o uso de substratos para a produção de biossurfactantes, inclusive substratos alternativos ou de baixo custo.

5.5. Ensaio para verificação da capacidade de produção de biossurfactantes.

5.5.1 Meios com fontes de carbono convencionais

5.5.1.1 Óleo de soja

Inicialmente os sete isolados foram testados para determinar a capacidade de produção de biossurfactantes utilizando óleo de soja como fonte de carbono, através da análise da tensão superficial do meio, que inicialmente era de 47 mN/m. 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 et al. 2004; Shepherd & Rockey 1995). A Figura 14 ilustra a redução da tensão superficial dos meios e o crescimento celular dos isolados em função do tempo de incubação. Foi observado que os meios inoculados com os sete isolados, às 24 horas de incubação, apresentaram redução na tensão superficial dos 47 mN/m iniciais para 31 mN/m (LBPF 1), 29 mN/m (LBPF 3), 32 mN/m (LBPF 7), 32 mN/m (LBPF 9), 38 mN/m (LBPF 10), 32 mN/m (LBPF 14) e 34 mN/m (LBPF 15). As reduções mantiveram-se em valores próximos aos observados as 24 horas de incubação até o final das avaliações para os isolados LBPF 9, LBPF 10 e LBPF 15, para os demais isolados a tensão superficial aumentou para valores próximos a 40 mN/m. Segundo Makkar & Rockne (2003) o biossurfactante também é uma fonte de carbono e muitas vezes mais assimilável que a fornecida para a sua produção portanto o aumento na tensão superficial pode ser explicado pelo fato dos isolados possivelmente terem consumido o biossurfactante por elas inicialmente sintetizado, permitindo assim a continuidade do crescimento dos isolados.

As maiores reduções nas tensões superficiais dos meios, observadas às 24 horas, de cultivo ocorreram com as células em crescimento exponencial. Esse fato foi observado por Rufino et al. (2007) estudando a produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica*. Os autores verificaram que a maior

redução da tensão superficial ocorreu na fase de crescimento exponencial. Partindo de valores iniciais de 50 mN/m foram obtidos valores mínimos de 30 mN/m às 24 horas de cultivo. Souza- Sobrinho (2007), estudando a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* utilizando soapstock como fonte de carbono, também obteve resultados semelhantes, sendo que às 24 horas de cultivo observou uma redução na tensão superficial de seus meios de 30 mN/m para valores mínimos de 26 mN/m. Segundo Amaral et al. (2006) a maioria dos biossurfactantes é geralmente produzida quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento. Porém algumas espécies podem apresentar produção durante a fase exponencial de crescimento

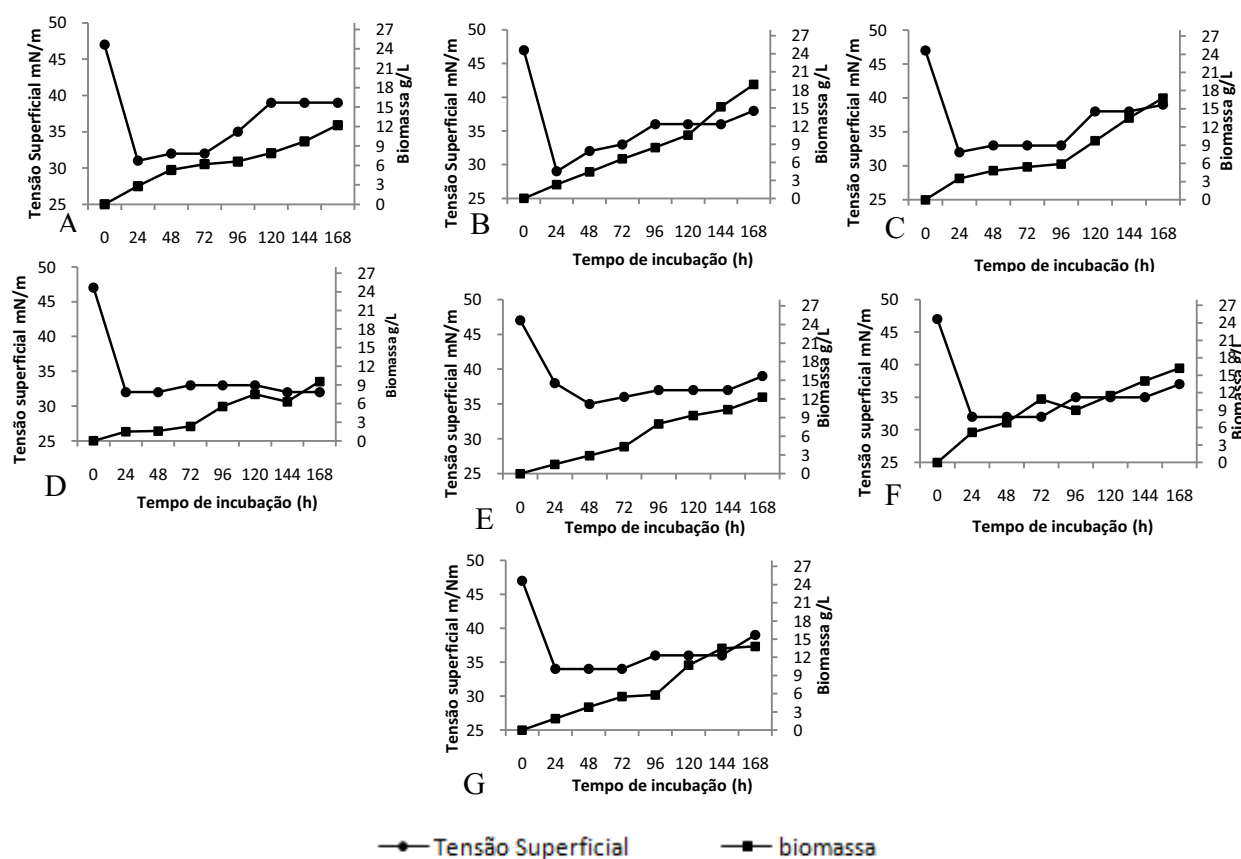


Figura 14 : Redução da tensão superficial dos meios de cultivo e crescimento celular em função do tempo de incubação para os diferentes isolados utilizando óleo de soja como substrato. A (LBPF 1); B (LBPF 3); C (LBPF 7), D (LBPF 9); E (LBPF 10); F (LBPF 14); G (LBPF 15)

Os dados obtidos da produção de biossurfactante pelos diferentes isolados em óleo de soja ao final das 168 horas são ilustrados na Tabela 4. Partindo de um valor inicial de pH de 5,78 foram observados valores finais variando de 3,99 a 4,87. Pode-se observar que após as 96 horas de cultivo os valores de pH aumentaram e junto a esse aumento ocorreu um leve acréscimo nos valores das tensões superficiais dos meios. Segundo Bednarsk et al., (2004) a manutenção da acidez do meio de cultivo é um parâmetro correlacionado com a eficiência da síntese de glicolipídeos por leveduras como *C. antarctica* e *C. apicola*. Com a manutenção e controle do pH durante os ensaios observa-se uma maior produção de glicolipídeos. Contudo, quando não se ajusta o pH dos meios de cultura, obtém-se um efeito negativo na eficiência de síntese desses produtos.

A biomassa celular aumentou durante todo o processo para os diferentes isolados, chegando ao final com valores que variaram de 9,55 g/L para LBPF 9 a 18,91 g/L para LBPF 3. A tensão superficial final dos meios que utilizaram óleo de soja como fonte de carbono variou de 32 a 39 mN/m. Dentre os isolados, o maior crescimento celular, 18,91 g/L, e a maior concentração final de produto, 13,86 g/L, foram observados para o isolado LBPF 3, porém o maior coeficiente de rendimento de biossurfactante em relação à concentração celular foi obtido pelo isolado LBPF 1.

Os resultados obtidos nesses ensaios são similares aos obtidos por Daverey et al. (2009) que estudaram a produção de biossurfactantes por *Candida bombiculata* em diferentes meios de cultura e obtiveram produção de 12,67 g/L e concentração celular final de 17,95 g/L, no meio que utilizou óleo de soja como fonte de carbono. Costa et al. (2008) utilizaram óleo de soja queimado para a produção de biossurfactantes por isolados de *Pseudomonas* sp. e obtiveram produção média de 6,1 g/L de produto, verificando reduções nas tensões superficiais dos meios de 35,5 mN/m para valores variando de 31 a 33 mN/m. Haba et al. (2000) verificaram reduções nas tensões superficiais dos meios de 57 mN/m, para valores variando de 35 mN/m a 40 mN/m, utilizando substratos de baixo custo (óleo de fritura) por diferentes espécies de leveduras.

Tabela 4: Pârametros da produção de biossurfactantes pelos isolados utilizando óleo de soja como substrato.

Parâmetros	Microrganismos						
	LBPF 1	LBPF 3	LBPF 7	LBPF 9	LBPF 10	LBPF 14	LBPF 15
Biomassa seca final (g/L)	12,22	18,91	16,78	9,55	12,31	16,2	13,8
BS¹ final (g/L)	9,13	13,86	7,98	3,0	4,4	4,2	4,9
Y p/b² (g/g)	0,75	0,73	0,48	0,31	0,36	0,29	0,4
TSα³ mN/m	31	29	32	32	38	32	34
pH	4,87	4,51	4,41	4,51	4,35	3,99	4,72

¹ BS= biossurfactante; ²Y p/b= coeficiente de rendimento de biossurfactante em relação à concentração celular; ³TSα= Tensão superficial mínima, obtida as 24 horas de incubação.

5.4.1.2 Petróleo e Óleo diesel

Para o petróleo como fonte de carbono foram realizados ensaios para biossíntese de surfactantes com todos os isolados, porém, após as análises iniciais constatou-se o não desenvolvimento dos isolados nessa fonte de carbono. O crescimento e a produção de biossurfactante em óleo cru é muito complexa devido a sua estrutura molecular que acaba tornando-o tóxico aos microrganismos presentes. Os ensaios utilizando óleo diesel mostraram a não utilização dessa fonte de carbono pelos isolados como substrato para a produção de substâncias tensoativas. O pH que inicialmente era de 5,74 reduziu para valores que variaram de 3 a 4,5. A tensão superficial inicial dos meios, 36 mN/m não sofreu redução durante as 168 horas de cultivo. Porém os isolados conseguiram se desenvolver,

com uma concentração celular final médio de 1 g/L. Resultados semelhantes foram observados por Mariano et al. (2008), ao estudarem a produção de biossurfactantes por *S. hominis* e *K. palustris*. Os autores observaram que nos meios utilizando óleo diesel comercial como fonte de carbono as tensões superficiais dos meios não reduziram, evidenciando a não produção de biossurfactantes, porém foi observado o crescimento dos microrganismos. Os valores de biomassa não foram citados.

Segundo Makkar & Rockne (2003) as fontes de carbono mais assimiláveis, tem a predileção dos microrganismos, portanto são consumidas preferencialmente as fontes de carbono mais complexas, no caso o petróleo e o óleo diesel. Os microrganismos utilizados neste trabalho foram extraídos de um local contaminado com óleo lubrificante, porém enriquecidos em um meio contendo óleo de soja como substrato, que é mais facilmente degradável em comparação ao petróleo e óleo diesel. Tal condição pode ter levado a seleção de microrganismos com afinidade a fontes de carbono mais assimiláveis. O isolamento de microrganismos com capacidade de produção de biossurfactantes em fontes de carbono complexas é complicado. Ilori et al. (2008) isolaram trinta e duas leveduras de um lago poluído com hidrocarbonetos de petróleo. Dentre os isolados, apenas dois utilizaram o óleo diesel e o petróleo como única fonte de carbono para a produção de biossurfactantes.

No seguinte trabalho, a produção de biotensoativos nessas fontes de carbono, provavelmente não ocorreu devido a complexidade de assimilação dessas moléculas pelos isolados.

5.4.1.3 Glicose

Os ensaios utilizando este carboidrato como fonte de carbono para produção de biotensoativos mostraram o crescimento celular de todos os isolados, porém somente o isolado LBPF 9 apresentou potencial para utilização deste substrato para produção de biossurfactantes.

O pH do meio de cultura utilizando glicose como fonte de carbono e inoculado com o isolado LBPF 9, era de 5,5 ao final das 168 horas de incubação reduziu para 4,33. A tensão superficial do meio que inicialmente era de 64 mN/m reduziu aproximadamente 39% chegando a 40 mN/m as 72 horas de incubação nesse mesmo período a biomassa celular do isolado era de 7,58 g/L. A maior redução na tensão superficial ocorreu após o período de crescimento exponencial, portanto o produto foi produzido na fase estacionária. Ao final das 168 horas de incubação a tensão superficial registrada foi de 47 mN/m, com uma concentração celular final de 6,2 g/L e uma concentração final de produto recuperado de 8,36 g/L. A Figura 15 ilustra a redução da biomassa e o crescimento celular durante o período de incubação.

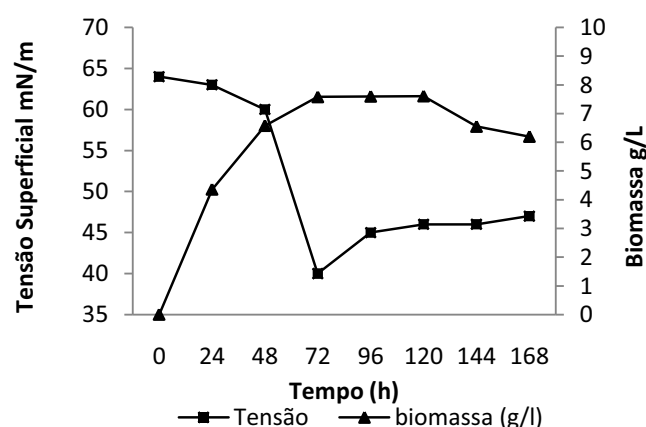


Figura 15: Redução da tensão superficial e crescimento celular em meio utilizando glicose como fonte de carbono inoculado com o isolado LBPF 9 .

Os resultados obtidos pelo isolado LBPF 9 foram semelhantes aos obtidos por Adamczak & Bednarski (2000), estudando a produção de biossurfactantes por *Candida antarctica* utilizando glicose como fonte de carbono e obteve uma produção final de 7,5 g/L e biomassa de 9,9 g/L (aeração de 1 vvm), com aeração de 2 vvm foi observado um aumento na produção para 13,2 g/L, a biomassa final obtida foi de 8,9 g/L.

Os demais isolados, apesar da não produção de biossurfactante, conseguiram se desenvolver, apresentando crescimento exponencial até às 72

horas de incubação. A Tabela 5 ilustra o crescimento dos isolados e pH dos meios ao final das 168 horas de incubação. O pH dos meios de cultura utilizando glicose como fonte de carbono que inicialmente era de 5,5 sofreram redução para valores finais variando de 3,5 a 4. A maior concentração celular final foi observada pelo isolado LBPF 14 (10,36 g/L) e a menor foi obtido pelo isolado LBPF 7 (3,1 g/L).

Tabela 5: Crescimento dos isolados e pH dos meios ao final das 168 horas de incubação utilizando glicose como substrato.

Parâmetros	Microrganismos						
	LBPF 1	LBPF 3	LBPF 7	LBPF 9	LBPF 10	LBPF 14	LBPF 15
Biomassa(g/L)	7,19	7,2	3,1	6,2	9,57	10,36	9,8
pH	3,62	3,61	3,58	4,33	4,8	4	3,4

A glicose é uma fonte de carbono facilmente assimilável, o que acarreta um rápido crescimento celular e conseqüentemente seu rápido consumo. No meio inoculado com isolado LBPF 9 foi observado após as 72 horas de incubação um aumento na tensão superficial e redução no crescimento do isolado, provavelmente pelo rápido consumo do substrato. Geralmente a glicose é combinada com outras fontes de carbono nos ensaios de biossíntese para obtenção de melhores resultados. Segundo Fontes et al., (2008) os carboidratos, também podem ser utilizados para produção de substâncias tensoativas. As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biosurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolipídeos, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas (formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano. Quando se combina essas fontes de carbono, as vias metabólicas são ativadas separadamente, levando os

microrganismos à economia energética, acarretando maior produção de substâncias tensoativas.

Sarubbo et al. (2006) produziram biossurfactante utilizando glicose e óleo de canola como fontes de carbono a partir da levedura *C. lipolytica*, que mostrou um crescimento de 10 g/L e uma concentração final de produto de 8 g/L.

Kim et al (2006) estudando a produção de manosileritritol lipídeo (mel) por *Candida sp*, observaram que a glicose era consumida rapidamente, evidenciando uma redução na produção desse biossurfactante. Para contornar o problema, foram utilizados óleo de soja e glicose juntos no meio fermentativo alcançando uma produção que variou de 22 a 44 g/L .

A utilização das fontes de carbono convencionais acarretou a produção de biossurfactantes pelos isolados, principalmente em óleo de soja por todos os isolados, por LBPF 9 em glicose, comprovando o potencial de produção do produto pelos mesmos.

5.5.2 Meios com fontes de carbono alternativas

5.5.2.1 Óleo de soja queimado

Os ensaios utilizando óleo de soja queimado mostraram que esse substrato não foi utilizado pelos isolados para a síntese de biossurfactantes, pois a redução da tensão superficial dos meios, quando ocorreu, foi muito pequena. O pH dos meios inicialmente era de 5,47 e foi reduzido ao final das 168 horas de cultivo para valores que variaram de 3,5 a 4, exceto o meio inoculado com o isolado LBPF 9, onde o pH aumentou para 7,5. As tensões superficiais dos meios que inicialmente eram de 40 mN/m, reduziram no máximo a 36 mN/m, e aumentaram com o decorrer do tempo cultivo. Costa et al., (2008) observaram resultados semelhantes ao utilizarem óleo de soja queimado como fonte de carbono para produção de biossurfactantes por bactérias do gênero *Pseudomonas*, a tensão superficial do meio inicialmente era de 35,5 mN/m e foi reduzida para 32 mN/m, porém, após as 72 horas de cultivo aumentou para 34,5 mN/m.

Apesar da não utilização dessa fonte de carbono pelos isolados como substrato para a produção de biotensoativos, os crescimentos celulares alcançados foram maiores quando comparados ao óleo de soja cru atingindo valores finais de biomassa que variaram de 20 a 30 g/L dependendo do isolado, exceto para os isolados LBPF 9 e LBPF 15 que registraram valores finais de biomassa inferiores a 3 g/L. Os valores de biomassa indicam que essa fonte de carbono alternativa poderia ser utilizada como substrato primário para indução de crescimento das leveduras para posterior produção de biossurfactante. A Tabela 6 ilustra os valores de biomassa seca e pH dos meios ao final das 168 horas de incubação.

Tabela 6: Crescimento dos isolados e pH dos meios ao final das 168 horas de incubação utilizando óleo de soja queimado como substrato.

Parâmetros	Microrganismos						
	LBPF 1	LBPF 3	LBPF 7	LBPF 9	LBPF 10	LBPF 14	LBPF 15
Biomassa(g/L)	23,55	33,19	26,89	1,61	31,22	20,77	0,38
pH	3,92	3,34	3,48	7,36	3,35	3,51	3,79

Segundo Makkar et al. (2002) o óleo de fritura é produzido em grandes quantidades tanto na indústria de alimentos como nas residências. Depois de ser utilizado, o óleo de cozinha queimado contém mais de 30% de compostos polares e sua composição muda de acordo com a variedade de alimento e tipo de fritura realizada. Essa variação em sua composição, devido sua origem, pode influenciar nos resultados obtidos na sua utilização como fonte de carbono para síntese de biossurfactantes.

Outros autores verificaram resultados distintos utilizando *Pseudomonas* ou isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* em óleos queimados de origens diferentes em seus experimentos. Haba et al. (2000) isolaram microrganismos com potencial de produção de biossurfactantes em óleos queimados, dos 36 isolados apenas 9 apresentaram potencial de produção de

biossurfactantes neste resíduo. Os isolados foram caracterizados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, e testados quanto a produção em óleo de oliva queimado e óleo de soja queimado. Os isolados apresentaram crescimento satisfatório nas duas fontes de carbono, porém, os resultados obtidos em óleo de oliva queimado foram melhores que os obtidos em óleo de girassol queimado. A tensão superficial inicial dos meios era de 57 mN/m e foi reduzida as 72 horas de incubação para valores que variaram de 32 mN /m para *Pseudomonas sp.* a 39 mN/m para *Ps. Fluorescens* utilizando óleo de oliva queimado como substrato. Em óleo de soja queimado os valores obtidos variaram de 36 mN /m para *Ps. aeruginosa* a 47 mN/m para *Pseudomonas sp.*

O óleo de soja queimado utilizado neste experimento permitiu o crescimento dos isolados, porém não apresentou viabilidade para a produção de biossurfactantes pelos mesmos. Portanto, a origem do óleo de fritura, bem como a espécie de microrganismo utilizado, podem influenciar diretamente no seu uso como substrato.

5.5.2.2 Soapstock e Soapstock pH inicial 6

Para os meios utilizando *soapstock* sem correção inicial de pH não foram observadas reduções nas tensões superficiais para todos os isolados exceto para LBPF 7 que apresentou uma pequena redução. Inicialmente a tensão superficial do meio inoculado com esse isolado era de 34 mN/m e reduziu para 29 mN/m as 48 horas de incubação. A pequena redução na tensão superficial em *soapstock* foi considerada positiva do ponto de vista de produção de biossurfactantes devido à característica saponificante encontrada neste substrato, levando a uma redução inicial da tensão superficial do meio, mesmo na ausência dos isolados. Essa propriedade dificulta a verificação da produção de biossurfactantes através da análise da tensão superficial dos meios.

Outros autores utilizaram o mesmo método para verificação da produção de tensoativos e observaram pequenas reduções nas tensões superficiais, porém, a produção de biossurfactantes ao final foi constatada. Costa et al (2008) utilizaram 2% de *soapstock* para produção de tensoativos por estirpes de

Pseudomonas. Os autores observaram redução na tensão superficial do meio de 35,5 para 31,9 mN/m e produção de 9,69 g/L de produto ao final dos ensaios. Souza - Sobrinho (2007) utilizou 5% de *soapstock* e 2,5% de milhocina como substrato para produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. A tensão superficial do meio foi reduzida de 30 para 26 mN/m e produção de 4,5 g/L de biossurfactante.

Ao final das 168 horas de incubação o meio inoculado com LBPF 7, apresentou tensão superficial de 29 mN/m, pH de 8,63 e produção de 1,72 g/L de biossurfactante, apesar do crescimento celular registrado, 0,7 g/L, ter sido o menor dentre todos os isolados. A Figura 16 ilustra o crescimento celular e a redução da tensão superficial do meio para este isolado.

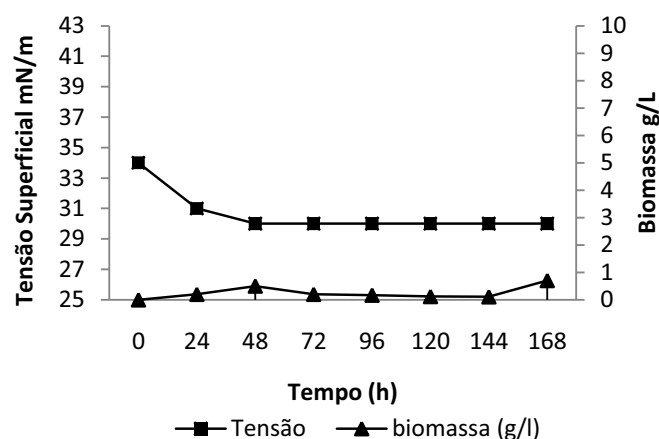


Figura 16: Redução da tensão superficial e crescimento celular do meio utilizando *soapstock* sem correção inicial de pH como fonte de carbono inoculado com o isolado LBPF 7.

Nos meios sem correção de pH foi observado uma redução inicial do pH de 9,1 para valores que variaram de 7,6 a 8,5, porém, ao final do tempo de incubação esses valores estavam acima de 8,7 para todos os isolados.

Os meios contendo *soapstock* apresentaram inicialmente caráter excessivamente alcalino. Para contornar essa situação foi sugerido a realização da correção inicial do pH para 6, valor normalmente utilizado para síntese de biossurfactantes, porém, as correções não surtiram efeito e meios com correção inicial de pH não indicaram a produção de biossurfactantes. O pH aumentou durante todo o ensaio chegando ao final das 168 horas de incubação a valores acima de 8,5. Costa et al., (2008) observaram resultados semelhantes nos ensaios utilizando *soapstock* como fonte de carbono, foi verificado uma variação entre 5,7 a 8,6 no pH dos meios e uma tendência para valores finais superiores a 8,0 quando esses substratos foram utilizadas como fontes de carbono, para produção de biossurfactantes. Apesar da não utilização do *soapstock* pela maioria dos isolados como substrato para a produção de biotensoativos, as leveduras cresceram satisfatoriamente indicando que essa fonte de carbono alternativa poderia também ser utilizada como substrato primário para indução de crescimento das leveduras para posterior produção de biossurfactante. Os ensaios com correção inicial de pH apresentaram maior crescimento quando comparados aos sem correção, exceto para o isolado LBPF 10, evidenciando que o pH inicial influencia diretamente o crescimento dos isolados. Os valores finais de biomassa seca e pH para os dois ensaios são ilustrados na Tabela 7.

Tabela 7: Crescimento dos isolados e pH dos meios ao final das 168 horas de incubação utilizando *soapstock* como substrato.

Parâmetros	Microrganismos						
	LBPF 1	LBPF 3	LBPF 7	LBPF 9	LBPF 10	LBPF 14	LBPF 15
<i>Soapstock</i>							
Biomassa							
(g/L)	4,83	7,54	0,7	3,92	15,4	6,12	14,1
Ph	8,22	8,63	8,58	8,4	8,68	8,55	8,89
<i>Soapstock</i> pH 6							
Biomassa							
(g/L)	9,75	10,67	6,18	4,56	3,89	10,23	18,65
Ph	8,22	8,51	8,44	8,63	8,54	8,49	8,31

O crescimento e a não utilização de fontes de carbono com caráter altamente hidrofóbico pela maioria dos isolados como substrato para a produção de biossurfactantes pode ser explicada, segundo Amaral (2007), pelo fato de algumas leveduras conseguirem consumir os substratos hidrofóbicos sem produzirem emulsificantes. Kaeppli & Fiechter (1976) realizaram testes de afinidade com *S.cerevisiae* e uma levedura assimiladora de substratos hidrofóbicos (*Candida tropicalis*). Essas leveduras foram adicionadas separadamente em um meio contendo um substrato hidrofóbico (hexadecano) e após agitação intensa e centrifugação, todo o hexadecano foi recuperado do meio contendo *S. cerevisiae* e para a levedura assimiladora de hidrocarbonetos encontrou-se uma relação linear entre o volume de substrato que ficou aderido na célula e a quantidade de células presente no meio, evidenciando o consumo direto do substrato. Entretanto, a mudança na fonte de carbono para um substrato hidrofílico (glicose), reduziu a capacidade de adsorção dessa levedura mostrando que a afinidade do microrganismo com a fonte de carbono é parcialmente induzida pelo tipo de substrato.

Cirigliano & Carman (1984) observaram em uma outra levedura do mesmo gênero (*Candida lipolytica*) a produção de agentes tensoativos quando a fonte de carbono utilizada foi o hexadecano, evidenciando a necessidade de produção de tensoativos para a o consumo desse substrato. Portanto, a assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada pela presença de um biossurfactante.

5.4.2.3 Glicerol

Partindo-se de uma tensão superficial de 68 mN/m, foi observada redução no valor desse parâmetro nos meios para todos os isolados, porém somente o isolado LBPF 9 obteve resultados significativos como potencial produtor de biossurfactantes neste resíduo. A Figura 17 ilustra o desenvolvimento celular e a redução da tensão superficial do meio inoculado com este isolado. A tensão superficial deste meio foi reduzida às 24 horas de incubação para 39 mN/m,

alcançando uma redução de aproximadamente 43%, a maior quando comparada com as demais fontes de carbono utilizadas neste trabalho. Ao final das 168 horas de cultivo foram observados no meio inoculado com este isolado os seguintes resultados: o pH que inicialmente era de 5,28 foi reduzido para 4,8; crescimento celular final de 2,95 g/L; concentração final de produto de 2,20 g/L e tensão superficial final de 42 mN/m. O coeficiente de rendimento de biossurfactante em relação à concentração celular foi 0,75 g/g, semelhante ao rendimento obtido nos meios utilizando óleo de soja como fonte de carbono. A maior redução na tensão superficial também ocorreu durante a fase de crescimento exponencial.

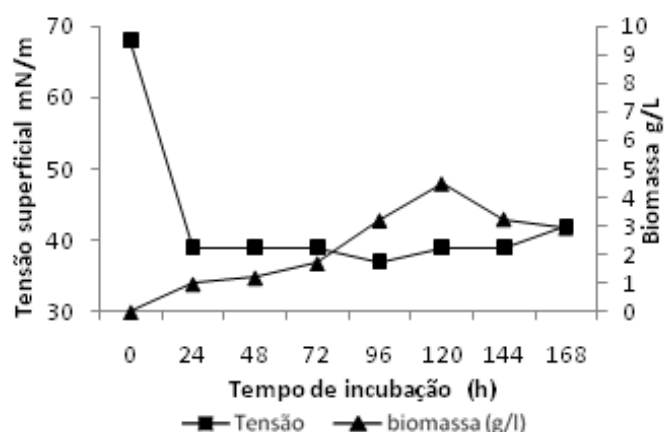


Figura 17: Redução da tensão superficial e crescimento celular em meio utilizando glicerol como fonte de carbono inoculado com o isolado LBPF9.

Os resultados obtidos por este isolado são semelhantes aos obtidos por Ciapina et al. (2006) estudando a produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis*, utilizando glicerol como fonte de carbono. Estes autores obtiveram uma produção de 1,7 g/L. Crasto (2005) avaliando a produção de ramnolípidios por bactérias isoladas de um poço de extração de petróleo, utilizando glicerol como fonte de carbono, relatou reduções nas tensões superficiais dos meios partindo de valores iniciais de 68 mN/m para valores finais que variaram de 44,6 a 53,7 mN/m, sendo que os volumes finais recuperados variaram de 0,33 a 1,9 g/L.

5.5.3 Meios com mistura de fonte de carbono alternativas e convencionais

5.5.3.1 Vinhaça e óleo de soja

A vinhaça é um resíduo produzido em larga escala pelas indústrias de bicomustíveis. Sua composição é muito rica em água e nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos, portanto a substituição da água pela vinhaça em processos de obtenção de tensoativos, além de gerar a redução do consumo de água e de resíduos a serem lançados no meio ambiente, leva a diminuição dos custos referentes à aquisição dos nutrientes adicionados aos meios.

Os ensaios realizados utilizando vinhaça ao invés de água em óleo de soja ou *soapstock* como fontes de carbono não mostraram resultados interessantes do ponto de vista da produção de biossurfactantes. Para o óleo de soja o pH inicial 4,49 aumentou para valores que variaram de 8 a 8,5 ao final das 168 horas de incubação. A tensão superficial desse meio inicialmente era de 36 mN/m não sofreu redução durante o período de incubação, porém, os crescimentos celulares registrados foram altos chegando a 33,5 g/L para o isolado LBPF 10. O meio composto por vinhaça e *soapstock* possuía pH inicial de 7 e esse valor também aumentou para valores que variaram de 8,5 a 9 ao final das 168 horas de incubação. A tensão superficial do meio, que inicialmente era de 32 mN/m, não apresentou redução durante o período de incubação, porém, os isolados, mostraram um bom crescimento celular com o valor de 38,67 g/L para o isolado LBPF 14, indicando que a utilização da vinhaça no lugar da água nos meios para indução de crescimento primário para posterior produção de biossurfactantes poderia vir a ser uma alternativa altamente promissora para se obter um rápido aumento de biomassa. Os valores finais de pH dos meios e de biomassa seca dos isolados para os ensaios utilizando vinhaça estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8: Crescimento dos isolados e pH dos meios utilizando Vinhaça/óleo de soja e Vinhaça/Soapstock ao final das 168 horas de incubação.

Parâmetros	Microrganismos						
	LBPF 1	LBPF 3	LBPF 7	LBPF 9	LBPF 10	LBPF 14	LBPF 15
Vinhaça/óleo de soja							
Biomassa							
(g/L)	17,94	31,12	21,73	22,89	36,46	14,52	33,35
pH	8,58	8,45	8,42	8,26	8,49	8,28	8,33
Vinhaça/Soapstock							
Biomassa	8,73						
(g/L)		11,23	12,32	11,47	14,05	38,67	36,79
pH	8,51	8,78	8,51	8,61	8,51	8,66	8,69

Os crescimentos celulares foram superiores aos obtidos nos meios que utilizaram água e óleo de soja. Esse grande crescimento pode ter levado a não utilização desses substratos para a síntese de biossurfactantes. Através da análise química da vinhaça foi observada a presença de nutrientes, indispensáveis ao crescimento das leveduras deixando o meio com um alto valor nutricional, além do açúcar residual que se torna mais uma fonte de carbono e mais facilmente assimilável pelos microrganismos. A união desses fatores favoreceu o crescimento das leveduras, levando-as a se multiplicarem ao invés de utilizarem os substratos para síntese dos produtos. Segundo Riera et al. (1985), a vinhaça, além dos nutrientes presentes, possui em sua composição uma grande quantidade de células lisadas que se equivalem ao extrato de levedura aumentando ainda mais o suporte para o crescimento dos microrganismos.

Na literatura não constam muitos trabalhos sobre a utilização de vinhaça para a produção de biossurfactantes, porém um dos trabalhos encontrados, realizado por Dubey & Juwarka no ano de 2001, obteve ótimos resultados quanto à redução da tensão superficial. Os autores estudaram a produção de biossurfactante utilizando vinhaça e a glicose como fonte de carbono por *Pseudomonas aeruginosa strain BS2* e observaram redução na tensão superficial dos meios de 54 para 27 mN/m, e um crescimento de 1×10^5 para 51×10^8 ufc/mL, mas observaram um péssimo rendimento na produção de biossurfactantes ao final das 96 horas de incubação cerca de 0,028 g/L, porém a vinhaça foi diluída em 3

vezes. Segundo os autores o uso da vinhaça sem diluição pode intervir no desenvolvimento do processo fermentativo devido a alta concentração de íons sulfato.

Nos ensaios realizados neste trabalho a vinhaça utilizada não foi diluída e os resultados obtidos quanto ao crescimento celular foram muito significativos.

5.5.3.2 Combinação de substratos alternativos e convencionais

Os ensaios utilizando duas fontes carbono uma hidrofílica e outra hidrofóbica demonstraram resultados diferentes dependendo das concentrações das fontes de carbono empregadas. Os cultivos contendo 2% de glicose e 4% de *soapstock* não mostraram viabilidade para a produção de biossurfactantes, porém o aumento da concentração das fontes de carbono para 4% de glicose e 10% de *soapstock*, induziu a produção de biossurfactantes pelos isolados LBPF 10 e LBPF 14.

Os meios utilizando glicose (2%) + *soapstock* (4%) e glicose (4%) + *soapstock* (10%) possuíam pH inicial de 7,83 e 7,6 respectivamente. Com o início dos ensaios foi observada redução de pH para valores que variaram de 5 a 6 até as 72 horas de incubação para o meio com as menores concentrações e 96 horas de incubação para os meios mais concentrados. Ao final das avaliações o pH estava em valores próximos aos iniciais. As reduções iniciais do pH dos meios utilizando glicose (2%) + *soapstock* (4%) e glicose (4%) + *soapstock* (10%) nas primeiras horas de incubação, podem estar ligadas a presença de glicose nos meios. Segundo Luna et al. (2008), a presença de glicose nos meios é fator determinante para a manutenção da acidez do mesmo durante a fase de crescimento exponencial.

Esse fato foi observado nos dois meios citados acima. Após o consumo da glicose os valores de pH aumentaram, quanto menor a quantidade de glicose presente no substrato mais rápido ocorreu o aumento.

As tensões superficiais dos meios que inicialmente eram de 30 mN/m para glicose (2%) + *soapstock* (4%) não reduziram para nenhum dos isolados inoculados. Para glicose (4%) + *soapstock* (10%) a tensão superficial inicial era de

33 mN/m e reduziu para LBPF 10 a 28 mN/m e LBPF 14 a 27 mN/m. Ao final das 168 horas de incubação as tensões superficiais dos meios se mantiveram nos valores obtidos com as reduções. As concentrações celulares obtidas ao final das 168 horas de cultivo foram de 26 g/L e 30 g/L e as concentrações finais de biossurfactantes foram 1,94 g/L e 2,24 g/L respectivamente para LBMF 10 e LBMF 14. A Figura 18 ilustra a redução da tensão superficial e o crescimento dos dois isolados. Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos obtidos por Ciapina et al. (2006), que verificaram produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis*, utilizando glicerol e hexadecano como substrato obtendo uma produção de 0,45 g/L de biossurfactante. Os ensaios foram realizados em mesa agitadora por 1 semana e sem correção de pH.

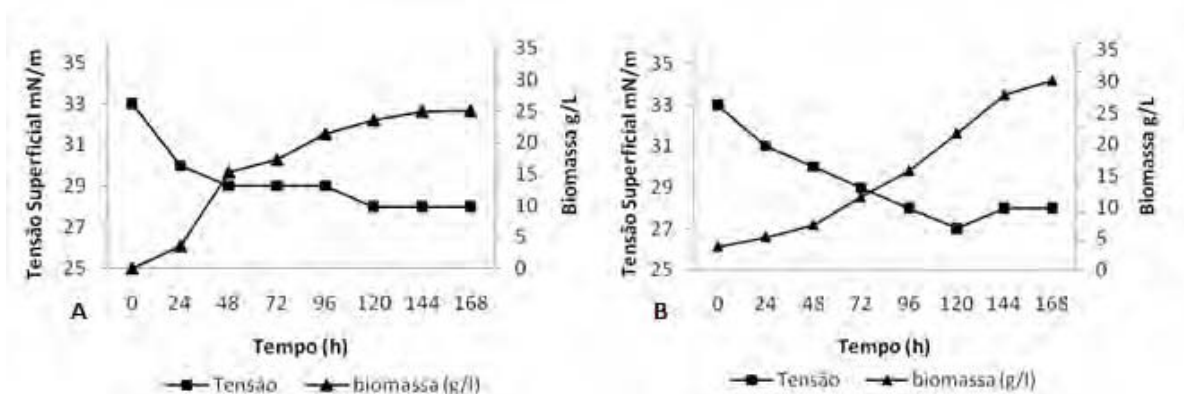


Figura 18: Reduções das tensões superficiais e crescimentos celulares dos meios utilizando glicose (4%) + soapstock (10%) como substrato inoculados com os isolados LBPF 10 (A) e LBPF 14 (B).

Apesar da não utilização dos substratos para a síntese de biossurfactantes pelos demais isolados, foi observado um bom crescimento celular deles em ambas as fontes de carbono, evidenciando que o substrato foi utilizado para o crescimento e não para a produção de substâncias com atividades surfactantes. A Tabela 9 ilustra o pH e a biomassa dos isolados ao final das 168 horas de incubação. Para a biomassa foram observadas concentrações finais que variaram

de 12 a 28 g/L para o meio que utilizou a menor concentração dos substratos, e de 24 a 35 g/L, para os meios mais concentrados.

Tabela 9: Crescimento dos isolados e pH dos meios utilizando Glicose (2%) + *soapstock* (4%) e Glicose (4%) + *soapstock* (10%) ao final das 168 horas de incubação.

Parâmetros	Microrganismos						
	LBPF 1	LBPF 3	LBPF 7	LBPF 9	LBPF 10	LBPF 14	LBPF 15
Glicose (2%) + <i>soapstock</i> (4%)							
Biomassa							
(g/L)	25,03	34	25,89	23,78	25,03	29,34	34,22
pH	6,89	7,33	6,97	7,35	7,85	7,64	7,54
Glicose (4%) + <i>soapstock</i> (10%)							
Biomassa							
(g/L)	23,99	15,12	12,46	16,03	27,78	16,89	24,99
pH	7,77	8,21	8,03	7,56	8,03	7,03	8,21

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com misturas de fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas. Bedinarsk et al. (2004) observaram resultados semelhantes aos obtidos nos meios contendo maiores concentrações de substrato. Ao estudarem a produção de biossurfactante por *C. antarctica* e *C. apícola* constataram que a concentração de biossurfactante recuperado dos meios aumentava quando a porcentagem de *soapstock* nos meios de cultivo era aumentada de 5% para 10%. Mesmo com a biomassa alcançando valores altos, essa produção em alguns casos chegava a ser oito vezes maior com a suplementação dessa fonte hidrofóbica. Observou-se também que a produção mantinha-se alta com a correção do pH para a faixa de 5,5 durante todo o período de incubação. Luna et al. (2009) verificou a produção de biossurfactantes por *Candida glabrata* utilizando diferentes concentrações de glicose e óleo de sementes de algodão. Os melhores resultados foram obtidos com 7,5% de óleo e 5 % de glicose. A redução da tensão superficial observada foi de 70 para 31 mN/m; o pH do meio aumentou para a faixa de 8 após o consumo da glicose. Sarubbo et al. (2007) observaram a produção de biossurfactantes por *C. lipolytica* utilizando 10% de glicose e 10% de óleo de canola. A tensão superficial do meio

foi reduzida de 69 para 35 mN/m. A produção de tensoativos foi registrada na fase de crescimento exponencial e os valores de biomassa foram de 20 g/L. Ao final dos ensaios foram recuperados 8 g/L do produto.

Ensaio utilizando fontes de carbonos hidrofílicas e hidrofóbicas em conjunto vêm abrindo uma nova porta para o aumento da produção de biossurfactantes, porém, os melhores resultados são obtidos em função das fontes de carbono utilizadas serem alternativas ou convencionais. Bedinarsk *et al.*, (2004) que utilizaram *soapstock* e glicerol (dois resíduos) obtiveram resultados inferiores aos obtidos por LUNA *et al.*, (2009) que utilizaram óleo de sementes de algodão e glicose.

5.6. Atividade surfactante dos produtos obtidos

Ao se analisar a atividade dos biossurfactantes produzidos utilizando óleo de soja como fonte de carbono foi observada a capacidade de redução da tensão superficial da água na presença dos bioprodutos obtidos. A Tensão superficial inicial da água era de 70 mN/m e foi reduzida para valores que variaram de 34 mN/m para o produto obtido pelos isolados LBPF 3 e LBPF 7 utilizando óleo de soja como substrato a 43 mN/m para o produto do isolado LBPF 9 utilizando glicerol como substrato. Estes valores de tensão foram semelhantes aos valores descritos para outros biossurfactantes produzidos por leveduras cultivadas em os óleos vegetais, como: *Candida lipolytica* 31 mN/m, Rufino *et al.* (2007); *Candida glabrata* 31 mN/m, Sarrubo *et al.* (2006); *Candida antartica* 35mN/m, Adamczak & Bednarski (2000). Os resultados apresentados no presente trabalho evidenciaram que os produtos obtidos a partir dos diferentes isolados possuem atividade surfactante. A Figura 19 ilustra a redução da tensão superficial da água na presença do produto obtido e purificado às 168 horas de cultivo.

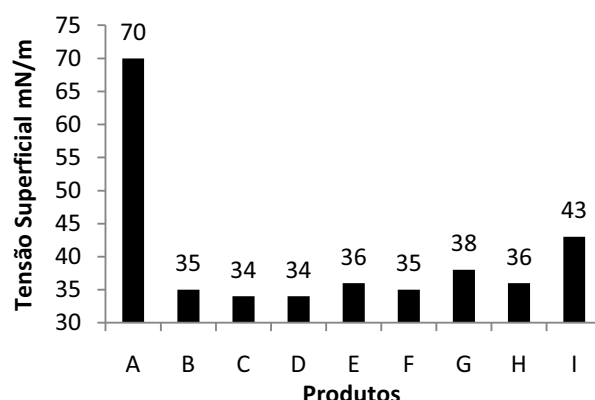


Figura 19: Redução da tensão superficial da água na presença dos diferentes produtos. A – Água pura, B- LBPF 1, C- LBPF 3, D- LBPF 7, E- LBPF 9, F- LBPF 10, G- LBPF 14, H- LBPF 15 e I- LBPF 9 obtido em glicerol.

Os resultados referentes à redução da tensão superficial da água demonstraram que os produtos obtidos apresentam excelente atividade surfactante, portanto os isolados poderiam ser utilizados como potenciais produtores de biossurfactantes e os produtos obtidos seriam de alta qualidade.

Ao final dos ensaios para biossíntese de biossurfactantes, foi constatada uma maior produção em óleo de soja e glicose com relação às outras fontes de carbono. Esse resultado já era esperado, pois o óleo de soja e a glicose são fontes de carbono usuais para a produção de biossurfactantes. Os resultados obtidos em glicerol foram muito relevantes, pois mesmo sendo um resíduo, um dos isolados foi capaz de utilizá-la como substrato e produzir substâncias tensoativas. Foi possível destacar também que a glicose 4% incrementada com *soapstock* 10% atingiu em alguns casos, resultados melhores que os meios utilizando glicose pura.

Foi observado o potencial de produção de biossurfactantes por todos os isolados em óleo de soja e pelo isolado LBPF 9 em glicose e glicerol, porém somente os isolados LBPF 9, LBPF 7, LBPF 10 e LBPF 15 apresentaram potencial de produção de biossurfactantes em resíduos agroindustriais. Apesar da não utilização dos substratos para a síntese de substâncias tensoativas pelos isolados nos demais substratos, foi constatado o crescimento de todos os isolados nas demais fontes de carbono, exceto em petróleo, com destaque para os meios de

cultivo que utilizaram água e óleo de fritura; água e *soapstock*; vinhaça e óleo de soja; vinhaça e *soapstock*, onde foram observadas altas concentrações celulares finais indicando que esses meios poderiam ser utilizados como meios de crescimento primário para indução do rápido desenvolvimento das leveduras e posterior produção de biossurfactantes.

Os meios de cultivo que induziram a produção de biossurfactantes evidenciaram que as concentrações obtidas não foram às esperadas quando comparadas a outras encontradas na literatura. A continuidade dos estudos visando à otimização das condições de cultivo com a finalidade de aumentar a concentração final dos produtos a serem obtidos pelos isolados se torna necessária.

6 Conclusões

- As metodologias empregadas para a obtenção do consórcio de leveduras e posterior inóculo original para o “screening” foram eficientes.
- Os isolados apresentaram potencial para a síntese de biossurfactantes em óleo de soja como substrato. Através da caracterização presuntiva dos isolados foi observado a presença de 3 espécies diferentes dentre os sete isolados. Todas as espécies caracterizadas pertenciam ao gênero *Candida*.
- A utilização dos demais substratos convencionais não viabilizou a produção de biossurfactantes pelos isolados
- Os isolados LBPF 7, LBPF 9, LBPF 10 e LBPF 15, apresentaram potencial de produção de biossurfactantes em resíduos agroindustriais, com destaque para LBPF 9 utilizando glicerol, resíduo da produção de biodiesel.
- Os produtos obtidos pelos isolados em óleo de soja apresentaram grande atividade surfactante reduzindo a tensão superficial da água para valores próximos a 30 mN/m.

- As maiores reduções nas tensões superficiais, tanto em óleo de soja quanto em glicerol foram observadas com os microrganismos em fase de crescimento exponencial.
- Os substratos que utilizaram água e óleo de fritura; água e *soapstock*; vinhaça e óleo de soja; vinhaça e *soapstock* evidenciaram um ótimo crescimento celular indicando que esses meios podem vir a ser utilizados para o desenvolvimento primário das leveduras para posterior síntese de biossurfactantes em processos de duas fases.

7. REFERENCIAS

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABIA. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**. 223, 143–151, 2008.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W.; Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. **Biotechnology Letters**. 22, 313-316, 2000.

AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M., BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**. 41,1894-1898, 2006.

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese apresentada ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da escola de química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em ciências 2007.

AMEZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, F.; ESPARZA-GARCIA, F.; RIOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VAZQUES, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, 98: 237-240, 2007.

AMORIM, H. V.; SOUZA, M. L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian Experience. **Sugar Journal**, 67, 11-14, 2005.

ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. A.; KHRAIS, C. H. A.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R. R.; FERNANDES, O. F. L. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno *CHROMagarTM CANDIDA*. **Revista de Patologia Vegetal**. 34,1, 37-42, 2005.

ARAÚJO, M.A. S. Caracterização molecular de espécies de *Candidas* Isoladas de portadores de AIDS e portadores de Câncer atendidos em Hospitais escola Máceio, Alagos. Tese de doutorado apresentada na Universidade Federal de Pernanbuco. 2006

BANAT, I..M. Characterization of biosurfactants and theyr use in pollution removal – State of the art (Review). **Acta Biotechnology**, 15, 251-267. (1995).

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

BEDNARSKI, W.; ADAMCSAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, 95: 15-18, 2004.

BENINCASA, M. V.; ABALOS, A.; MORAES, I. O.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, 85, 1-8, 2004.

BENINCASA, M.; F.R. ACCORSINI. Rhamnolipid Produced from Agroindustrial Wastes Enhances Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil. **Current Microbiology**, 20, 3843-3849, 2007.

CASAS, J.; OCHOA, F. G.; J. Sophorolip production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Bioscience. Bioeng.** 88, 488-494, 1999.

CASTELLANELLI, C.; MELLO, C.; RUPPENTHAL, J. E.; HOFFMANN, R.. Óleos comestíveis: o rótulo das embalagens como ferramenta informativa. In: **I Encontro de Sustentabilidade em Projeto do Vale do Itajaí**. 2007.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório para estabelecimento de valores orientados para solo e águas subterrânea no Estado de São Paulo. 2005. WWW.cetesb.com.br acesso em junho de 2009.

CHEN, J.; SONG, X.; ZHANG, H.; QU, Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 501-506, 2006.

CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTA ANNA, L. M. M.; SANTOS, A. S.; FREIRE, D. M. G.; PEREIRA JR, N. Biosurfactant Production by *Rhodococcus erythropolis* Grown on Glycerol As Sole Carbon Source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 880 129–132, 2006.

CIRIGLIANO M.C, CARMAN G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl Environ Microbiol**. 48,4: 747–750, 1984.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 28, 34-38, 2008.

CRASTO, C. J. T. L. Avaliação da produção de raminolipídios por bactérias isoladas de poços de petróleo. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos para a obtenção do título de mestre em biotecnologia. 2005

DAVEREY, A., PAKSHIRAJAN K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**. 42, 499–504, 2009.

DE LIMA C. J. B.; J. CONTIERO. Use of Soybean Oil Fry Waste for Economical Biosurfactant Production by Isolated *Pseudomonas aeruginosa* Using Response Surface Methodology. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. 3, 2: 162-171, 2009.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial application. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 61, 1: 47-74, 1997.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in biosurfactants. **Comptes Rendues Chimie**, 7: 641-646, 2004.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their comercial application. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, 47-74, 1997.

DUBEY, K. JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 17, 61-69, 2001.

FELSE, P.A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophoroplid biosyntesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 40: 316-323, 2007.

FONTES, G. C.; AMARAL P. F. F. E COELHO, M, A, Z,. Produção de biossurfactante por levedura. **Quimica Nova**, 31:8, 2091-2099, 2008.

GARCÍA-MATOS, P.; GARCÍA-AGUDO, R.; HERNÁNDES-MOLINA, J.M.; MARÍN, P.; TARELLO, E.; MIRA, J. Identification de leveduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. **Rev Iberoam Micol**, 15, 131-135, 1998.

GUIDI, R-H, Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares para estirpes de leveduras contaminantes da fermentação etanolica. **Dissertação de mestrado em microbiologia agropecuária**. 32-50, 2000.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**. 88, 379–387, 2000.

HIRATA ,Y., YUKAODA M., IGARASHI, K. , A. MASAKI SUGIURA, T. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Saraya Co Ltd.** 24-12, 2009.

ILORI, M. O. SUNDAY A. ADEBUSOYE, ADEDOYIN C. O.J.O. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. **World J Microbiol Biotechnol** 24:2539–2545, 2008.

JING, C.; XIN, S.; HUI, Z.; YINBO Q.; Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae* . **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 501–506, 2007.

KAEPPELI, O.; FIECHTER, A.. “The mode of interactions between the substrate and cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis*”, **Biotechnol. Bioeng.**, 18, 967-974, 1976.

KATEMAI, W.; MANEERAT. S.L; KAWAI, F.; KANZAKI, H.; NITODA T.,,. H-KITTIKUN, A .Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4 . **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 54, 79–82 .2008.

KIM, Y. B.; RHEM, H. J. Studies on a mixed culture of *Candida parapsilosis* and different bacilli on alkane ; **Eur. J. Appl. Microbiol.**, 19, 112-119, 1982.

KIM, H-S, JEON, J-W.; KIM, S-B; OH, H-M; KNOW, T-J; YOON, B-D. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid bisurfactant, mannosylerythritol lipid from *Candida antartica*. **Biotechnology Letters**, 24: 1637-1641, 2002.

KIM, H. S.; JEON, J. W.; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H.; YOON, B. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by

Candida sp. SY16 using fed-batch fermentation D.; **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70, 391- 396, 2006.

KITAMOTO, D.; HANEISHI, K.; NAKAHARA, T.; TABUCHI T. .Production of Mannosylerythritol Lipids by *Candida antarctica* from Vegetable Oils Agric. **Biol. Chem.**, 54 :1, 37-40, 1990.

KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, G. T.; SASAKI, A.; TAKEYAMA, Y.; IDEMOTO, Y.; KOURA, N.; YANAGISHITA H. Microbial conversion of *n*-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. **Biotechnology Letters** 23: 1709–1714, 2001.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants, **J. Biosci. Bioeng.** 94, 187–201, 2002.

KITAMOTO D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 14. 315–328, 2009.

KONISHI, M.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 78, 37–46, 2008.

KONISHI, M.; MORITA T., FUKUOKA, T.; IMURA T.; KITAMOTO, D. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*, **J. Oleo Sci.** 57, 359–369, 2008.

KOSARIC, N.; GRAY, N.C.C.; CAIRNS, N.L. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. *In: Biotechnology: a comprehensive treatise*, vol 8, ed. H. J. Rehm & G. Reed, Weinheim, Germany, 574-591, 1983.

KOSARIC, N. Biosurfactants ad their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, 39 (4): 295-304, 2001.

LIMA, C. J. B.; CONTIERO,J. Use of Soybean Oil Fry Waste for Economical Biosurfactant Production by Isolated *Pseudomonas aeruginosa* Using Response Surface Methodology. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy** 3, 162-171, 2009.

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

LIU, Q.; DONG, M.;ZHOUA, W.; AYUB M.; ZHANG, Y.P.; HUANG, S. Improved oil recovery by adsorption-desorption in chemical flooding. **Journal of Petroleum Science Engineering**, 43: 75-86, 2004.

LODDER, J. The Yeast: a taxonomic study. Oxford. **North Holand Publishing**. 1 144-176, 1970.

LUNA, J.N.; RUFINO, D.R.; SARUBBO, L.A.; TAKAKI, G.M.C. Produção de Biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**. 6: 2 209-215, 2008.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of Stability and Application in OilRecovery. **Brazilian archives of biology and technology**. 52, 785-793, 2009

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

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

MAKKAR, R.A.; ROCKNE, K.J, Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environ Technol Chem.**22,10: p 2280-2292, 2003.

MARIANO A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F. PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** 25, 269 - 274, 2008.

MARQUÉS A.M., PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M.J. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**, 158 110–117, 2009.

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

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUARIA, COORDENAÇÃO-GERAL DE APOIO LABORATORIAL. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos. Cap 2 pg 112-117, 2007.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo..**ed. atual. e ampl. Lavras**, 2. 729- 751, 2006.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA T.; KITAMOTO, D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T. **Journal of bioscience and bioengineering** . 104: 1, 78–81, 2007.

MULLIGAN, C.N. Enviromental applications for biosurfactants. **Env. Polut.** 133, 183-198, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, 25, 772-776, 2002.

ODDS, F.C.; BERNARTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol.** 32, 1923-1929, 1995.

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida liposurfactant* by a known oil degrader. In *Ocean Technology Per- lytica* : formation of a biosurfactant. Effects on respiratory activity *spectives* ed. Kumar, S., Agadi, V.V., Keshavdas, V. and Desai, and growth **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 8, 91-101 ,1979.

PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, 2006.

QUINDÓS, G.; ALONSO-VARGAS, R.; HELOU, S., ARECHAVALA, A.; MAZUELOS, E.M.; NEGRONI, R. Evaluación de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. **Rev Iberoam Micol** 18, 23-28, 2001.

RAIJ. B-V; Andrade, J-C; CANTARELA, H; QUAGGIO, J-A. Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. **Instituto Agrônômico de Campinas**. 4: 21-190, 2005.

REINERT, D.J.; REICHERT J. M. Propriedades físicas do solo. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS** Santa Maria, 1. 5-24, 2006.

RIERA, F.S.; CORDOBA, P.; SINERTZ, F. Use of the UASB reactor for the anaerobic treatment of stillage from sugarcane molasses. **Biotechnology and Bioengineering** 27, 1710-1716, 1985.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; BOSH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.1, n. 2, 871-874, 1989.

ROCHA, M.V.P.; OLIVEIRA, A.H.S.; SOUZA, M.C.M.; GONCALVES, L.R.B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 22: 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L.R.; TEIXIERA, J.A. VANDER MEI, H.C.; OLIVEIRA, R. Physicochemical and gfunctional charachterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 49: 79-86, 2006.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI.; G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate .**World J Microbiol Biotechnol**. 23, 729–734, 2007.

SARUBBO, L.A.; MARCAL, M.C., NEVES, M.L.C. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 95: 59-67, 2001.

SARUBBO, LA.; DE LUNA.; JM, de Campos-Takaki GM Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electron J Biotechnol** 9: 6-15, 2006.

SARUBBO, L.A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Co-Utilization of Canola Oil and Glucose on the Production of a Surfactant by *Candida lipolytica* **Current Microbiology**. 54, 68-73, 2007.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **J Biotechnol** 40:207–217, 1995.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical science. **TRENDS in Biotechnology**, . 22, . 3, . 142-146, 2004.

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

SOUZA- SOBRINHO, H.B. Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Controle do crescimento de microrganismo. **Microbiology**. 6, 182- 206, 2002.

VAN DER VALT, R.P. & YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In: KREEGER-van RIJ, N.J.W. The Yeast: A Taxonomic Study. Third revised and elayed edition. Amsterdam: **Elseiver Science Pub.** 45, 02 813-821, 1984.

YOUSSEF, K. M.; SCATTERGOOD, R. O.; MURTY, K. L.; KOCH. C. C. Ultratough nanocrystalline copper with a narrow grain size distribution. **Appl. Phys. Lett.** **85**, 929, 2004.

YUCESoy, M.; MAROL, S. Performance of CHROMagar Candida and BIGGY agar for identification of yeast species. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 2: 1-8, 2003.