



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química

THAMIRYS GIMENES COUTINHO DE SOUSA

SELEÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *RHODOTORULAS* DO  
AMBIENTE ANTÁRTICO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

CAMPINAS  
2016

THAMIRYS GIMENES COUTINHO DE SOUSA

SELEÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *RHODOTORULAS* DO AMBIENTE  
ANTÁRTICO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

*Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia Química da Universidade Estadual  
de Campinas como parte dos requisitos exigidos  
para obtenção do título de Mestra em  
Engenharia Química.*

*Orientador:* PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA  
THAMIRYS GIMENES COUTINHO DE SOUSA, E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. ELIAS BASILE  
TAMBOURGI

CAMPINAS  
2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 133620/2014-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

So85s Sousa, Thamirys Gimenes Coutinho, 1992-  
Seleção das leveduras do gênero *Rhodotorulas* do ambiente Antártico para produção de biossurfactante / Thamirys Gimenes Coutinho de Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Surfactante. 2. Leveduras. 3. Produção. 4. Caracterização. 5. Antártica.  
I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Screening of *Rhodotorula* yeast from Antarctica environment for biosurfactant production

**Palavras-chave em inglês:**

Surfactant

Yeast

Production

Characterization

Antarctica

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Juliana Ferrari Ferreira

Priscila Gava Mazzola

**Data de defesa:** 12-02-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado defendida por Thamirys Gimenes Coutinho de Sousa e aprovada em 12 de Fevereiro de 2016 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi (orientador)

Dra. Juliana Ferrari Ferreira

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola

As assinaturas originais da banca examinadora se encontram na Ata de Defesa da Tese e no processo de vida acadêmica.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha irmã e a toda minha família que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada;

Aos professores Elias Basile Tambourgi, Edgar Silveira Campos e Ubirajara Coutinho-Filho, por todos os ensinamentos, paciência e confiança e auxílio no desenvolvimento deste trabalho de mestrado. Foi um prazer tê-los como professores orientadores;

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Mãe, Suely Maria, seu cuidado e dedicação me deram a força para seguir;

Pai, Clarismar Gimenes, sua presença me transmitiu segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada;

Minha irmã, Camila Coutinho, por sempre me ajudar, me auxiliar nos momentos de desespero e me mostrar que sou capaz;

Aos meus colegas dos laboratórios, Daniela, Juliana, Amanda, Diego, André, Taís, Nathiele e Géssika, pela ajuda constante, tanto nos experimentos quanto nas matérias, pelas horas de lazer, pelos risos e pelo companheirismo;

Às minhas amigas, Fernanda, Victória, Isbela, Thalita que desde a faculdade me deram apoio, comemoraram comigo e me aguentaram nas fases difíceis;

À Marihá, por todos esses 16 anos de amizade, dedicação, amor, compreensão e diversão;

E a todos os amigos, que fizeram parte desta caminhada, compartilhando os momentos bons e ruins, mostrando que apesar de tudo eu não estava sozinha;

Ao Cnpq pela oportunidade de aprimorar-me profissional e pessoalmente, pelo auxílio financeiro ao projeto e à bolsa concedida.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

Theodore Roosevelt

## RESUMO

Surfactantes microbiológicos são metabólitos ativos de superfície, produzidos por microrganismos que possuem baixa toxicidade, são biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, estas moléculas são estáveis em condições ambientais extremas, como mudanças de pH, temperatura e salinidade. A seleção de microrganismos capazes de produzir biossurfactantes tem sido investigada nos últimos anos e a Antártica tornou-se de grande interesse devido a sua extraordinária diversidade. O presente trabalho relata a avaliação da produção de biossurfactantes por quatro leveduras isoladas da Antártica, codificadas como L69, L87, L104 e L106. A solução contendo biossurfactante foi obtida após cinco dias de fermentação, em um meio padrão de levedura e incubada a 15 e 30°C. Os resultados mostraram que as leveduras foram capazes de produzir biossurfactante e que a L69 e a L104 obtiveram os melhores resultados, considerando como critério de seleção a emulsificação em querosene em ambas as temperaturas: a L69 com 89 e 98% e a L104 com 94 e 78%, a 15 e 30°C, respectivamente. Posteriormente, traçou-se uma curva de crescimento com o intuito de determinar a temperatura ótima, sendo 15°C para L69 e 30°C para L104. Alguns testes para caracterização da biomolécula também foram realizados, tais como estabilidade, CMC e análise de infravermelho. Para a L104, os testes de estabilidade demonstraram que a molécula não se manteve estável em quase todas as condições testadas, apresentando índice abaixo de 60%. O biossurfactante da levedura L69 apresentou estabilidade em valores neutros até razoavelmente básicos de pH, temperaturas abaixo de 60 °C e concentrações de sais inferiores a 50 g/L. Em relação a CMC, foi 2 e 20 g/L para L69 e L104, respectivamente. Na análise de infravermelho, nota-se que as duas biomoléculas são similares, fato que pode ser devido às duas leveduras pertencerem ao mesmo gênero. Desse modo, após todas estas análises, foi possível confirmar a capacidade produtiva de *Rhodotorulas* isoladas do ambiente antártico, sendo que a *Rhodotorula mucilaginosa*, codificada por L69, apresentou os melhores resultados, podendo ser de grande interesse industrial sua produção em larga escala.

Palavras-chave: Surfactantes. Microrganismo. Leveduras. *Rhodotorulas*. Antártica.

## ABSTRACT

Microbial surfactants are surface-active metabolites, produced by microorganisms which have low toxicity, are biodegradable and biocompatible. Furthermore, these molecules are stable in extreme environmental conditions, such as pH, temperature, and salinity changes. The selection of microorganisms capable to produce biosurfactants has been investigated in the last years and the Antarctic environment has become of great interest due to its extraordinary diversity. The present work reports the evaluation of biosurfactant production by four Antarctic isolated yeasts, coded as L69, L87, L104, and L106. The biosurfactant containing solution was obtained from a five day old fermentation broth, composed by glucose and incubated at 15 °C and 30 °C. The results showed that these yeasts were capable to produce biosurfactants, and the L69 and L104 yeast showed the best results, considering as a selection criterion the emulsification in kerosene at both temperatures: the L69 with 89 and 98% and, the L104 with 94 and 78% at 15 and 30 °C, respectively. Subsequently, has traced a growth curve aiming at determining the optimum temperature, being 15°C to L69 and 30°C to L104. Some characterization tests of the biomolecule were also performed, such as stability, CMC and infrared analysis. For L104, stability testing demonstrated that the molecule is not remained stable in almost all conditions tested, with index below 60%. The biosurfactant of yeast L69 was stable in neutral values until fairly basic of pH, temperatures below 60°C and salt concentrations lower than 50 g /L. In relation to CMC, was 2 and 20 g /L for L69 and L104, respectively. About infrared analysis, it is noticed that the two molecules are similar, which may be due to both yeasts belong to the same genre. Thereby after all these analyzes was possible to confirm the productive capacity of *Rhodotorulas* isolated from the Antarctic environment, and the *Rhodotorula mucilaginosa*, encoded by L69, showed the best results and a large-scale production can be of great industrial interest.

Keywords: Surfactants. Microorganism. Yeast. *Rhodotorulas*. Antarctica.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via sintética das partes polar e apolar do biossurfactante, utilizando carboidratos como fonte de carbono. Enzimas envolvidas: A. fosfofrutoquinase; B. piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato lipase; E. piruvato desidrogenase; F. piruvato carboxilase.....	24
Figura 2: Metabolismo bioquímico para síntese da molécula do surfactante, tendo como fonte de carbono hidrocarbonetos. as enzimas envolvidas são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose-1,6 bifosfatase .....	25
Figura 3: Índice de Emulsificação (%) nos diferentes óleos testados. ....	42
Figura 4: Tensão superficial ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). ....	43
Figura 5: Índice de Emulsificação em Querosene (%) nos diferentes meios testados. ..	46
Figura 6: Massa seca (g/L), leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C.....	48
Figura 7: Glicose (g/L), leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C. ....	48
Figura 8: Índice de emulsificação (%), leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C. ....	49
Figura 9: Tensão Superficial ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C.....	50
Figura 10: Cinética de crescimento da L69 e produção da biomolécula, a 15 oC. ....	51
Figura 11: Cinética de crescimento da L104 e produção da biomolécula, a 30 oC. ....	52
Figura 12: Teste de Estabilidade frente a variações de temperatura, da levedura L69. .	53
Figura 13: Teste de Estabilidade frente a variações de pH, da levedura L69.....	54
Figura 14: Teste de Estabilidade frente a variações de salinidade [NaCl], da levedura L69. ....	54
Figura 15: Teste de Estabilidade frente a variações de temperatura, da levedura L104.	56
Figura 16: Teste de Estabilidade frente a variações de pH, da levedura L104.....	56
Figura 17: Teste de Estabilidade frente a variações de salinidade [NaCl], da levedura L104.....	57
Figura 18: Concentração micelar crítica da levedura L69.....	58
Figura 19: Concentração micelar crítica da levedura L104.....	59

Figura 20: Resultado da análise de infravermelho do biossurfactante produzido pela levedura L69.....	60
Figura 21: Resultado da análise de infravermelho do biossurfactante produzido pela levedura L104.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das leveduras foco de estudo do presente trabalho.....	34
Tabela 2: Resultados da análise de massa seca, presença/ausência de corpo de fundo e consumo de glicose.....	39
Tabela 3: Resultados da análise de índice de emulsificação, colapso e espalhamento da gota e tensão superficial. ....	41
Tabela 4: Resultados da análise de massa seca, presença/ausência de corpo de fundo e consumo de glicose para o meio B. ....	44
Tabela 5: Resultados da análise de índice de emulsificação em querosene nos diferentes meios testados.....	45
Tabela 6: Teste de estabilidade, levedura L69 a 25°C.....	53
Tabela 7: Teste de estabilidade, levedura L104 a 25°C.....	55
Tabela 8: Resultados da análise de rendimento, das leveduras L69 e L104, em suas respectivas temperaturas ótimas, 15 e 30 °C. ....	57

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivo Geral .....	17
2.2. Objetivos Específicos .....	17
<b>3. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>18</b>
3.1. Sufactantes Sintéticos e Biossurfactantes.....	18
3.1.1. Surfactantes Químicos .....	18
3.1.2 Sufactantes Biológicos.....	19
3.1.2.1. Vantagens e Desvantagens .....	20
3.1.2.2. Método de Produção.....	21
3.1.2.2.1. Processo Fementativo .....	21
3.1.2.2.1.1. Meio de Cultivo .....	24
3.1.2.2.1.2. Resíduos Industriais.....	26
3.1.2.3. Microrganismos.....	27
3.1.2.3.1. Leveduras .....	27
3.1.2.3.1.1. <i>Rhodotorula</i> .....	27
3.1.2.3.1.2. Leveduras da Antártica .....	28
3.1.3. Propriedades dos Surfactantes .....	30
3.1.4. Propriedades Específicas dos Biossurfactantes .....	32
3.1.5. Aplicações.....	32
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>34</b>
4.1. Microrganismos.....	34
4.2. Meios Testados.....	34
4.3. Condições de Cultura e Materiais .....	35
4.4. Preparo das Amostras .....	35
4.5. Massa Seca .....	35
4.6. Consumo de Glicose.....	35
4.7. Atividade de Emulsificação.....	36
4.8. Tensão Sferficial .....	36

4.9. Colapso da Gota .....	36
4.10. Espalhamento da Gota.....	37
4.11. Teste de Estabilidade.....	37
4.12. Concentração Micelar Crítica (CMC) .....	37
4.13. Purificação do Biossurfactante Produzido.....	38
4.14. Análise Infravermelho .....	38
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>39</b>
5.1. Análise do Crescimento Celular.....	39
5.2. Análise da Produção de Biossurfactante .....	40
5.3. Avaliação da Influência do meio no crescimento dos microrganismos e produção da biomolécula .....	44
5.4. Curva de Crescimento das Leveduras L69 e L104.....	47
5.4.1. Análise de Massa Seca.....	48
5.4.2. Consumo de Glicose .....	48
5.4.3. Índice de Emulsificação.....	49
5.4.4. Tensão Superficial .....	50
5.4.5. Cinética de crescimento microbiano e produção do biossurfactante .....	51
5.5. Caracterização do Biossurfactante Produzido .....	53
5.5.1. Teste de Estabilidade .....	53
5.5.1.1. Levedura L69 .....	53
5.5.1.2. Levedura L104 .....	55
5.5.2. Análise de rendimento .....	57
5.5.3. Concentração Micelar Crítica .....	58
5.5.4. Análise de Infravermelho.....	60
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>Referências.....</b>	<b>64</b>

## 1. Introdução

Surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, são constituídas por uma porção hidrofóbica e por outra hidrofílica. Devido esta característica apresentam propriedades, como: redução da tensão superficial e interfacial de misturas imiscíveis, da concentração crítica de micelas, entre outras particularidades que os tornam alvos de estudo e interesse de diversas modalidades industriais: petroquímicas, alimentícias, de bebidas, cosméticas, farmacêuticas, de mineração, metalúrgicas, agroquímicas, de fertilizantes, ambiental, de papel e celulose, entre diversos outros ramos (GHOJAVAND, et al., 2008, BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000, MULLIGAN e GIBBS, 1993, KOSARIC, et al., 1992).

Os tensoativos produzidos quimicamente são obtidos a partir de derivados de petróleo ou fontes de olequímicas (DESAI e BANAT, 1997), por isso podem apresentar um grau de toxicidade, o que dificulta a degradação imediata no ambiente, logo, seu uso ainda é restrito (SARKAR, et al., 1989). Com a crescente conscientização em relação a proteção do meio ambiente, o surgimento de novas leis de controle ambiental (NITSCHKE e PASTORE, 2002) e a intenção de contornar outras desvantagens na utilização de surfactantes sintéticos, os biosurfactantes vem sendo alvos de pesquisas, entretanto a sua produção ainda não é viável economicamente, quando comparada a produção do surfactante químico (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Segundo Bognolo (1999), surfactantes de origem natural são produzidos por diversos grupos de organismos, como: os microrganismos, plantas e até os seres humanos. Os Biosurfactantes são biomoléculas produzidas por microrganismos que apresentam, praticamente todas as características dos surfactantes sintéticos, além disso, possuem baixa ou nenhuma toxicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e especificidade, e a maioria se mantém estável em condições ambientais extremas (variações de pH, temperatura e salinidade), o que os torna substitutos apropriados para os sintéticos (DESAI e BANAT, 1997). Existem diversos tipos de biosurfactantes, sua classificação é baseada nas propriedades físico-químicas, em: glicolipídios, lipopeptídeos, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios e poliméricos (PACWA-PLOCINICZAK, et al., 2011, CAMEOTRA, et al., 2010, AMARAL; COELHO; MARRUCHO, 2010, STELLER e VATER, 2000).

As funções biológicas dos biosurfactantes ainda não estão totalmente esclarecidas, sabe-se que eles são capazes de emulsificar, transportar e solubilizar hidrocarbonetos em soluções que antes eram insolúveis, e isto propicia o crescimento de microrganismos nesses ambientes, essa propriedade pode ser utilizada para biorremediação de áreas contaminadas

(FRANCY, et al., 1991, KÄPPELI e FIECHTER, 1977). Ademais essa biomolécula possui função de aderência-liberação da célula a superfícies e atividade antibiótica, por exemplo a surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina produzidas por *Bacillus sp* (MAIER, 2003, STELLER e VATER, 2000, ROSENBERG e RON, 1999, LIN, 1996).

O crescente interesse das indústrias na melhoria da produção de biosurfactante, promoveu o aumento na investigação de micro-organismos capazes de produzi-los. Com isso, a seleção de culturas microbianas isoladas de ecossistemas variados tornou-se uma possibilidade a ser explorada. Entre estes biosistemas, a Antártica se destacou por ser um ambiente inóspito para sobrevivência e, apesar disso, apresentar uma extraordinária diversidade microbiana.

Na busca por novos microrganismos para aplicação biotecnológica, a Antártica é uma das áreas geográficas preferida pelos microbiologistas, por exibir uma das condições mais extremas da Terra, apresentando locais muito frios e secos, alguns altamente salinos com solos caracterizados pela baixa umidade, baixíssimo conteúdo orgânico, alta incidência de radiação UV e quantidade insuficiente de água para os organismos vivos (BUZZINI, et al., 2012, PAVLOVA, et al., 2011, CONNELL, et al., 2008). Os microrganismos, plantas e animais que vivem em ambientes frios se adaptam metabólica e fisiologicamente para garantir sua existência, por isso, bactérias, leveduras, fungos e algas unicelulares provenientes de situações extremas, são interessantes cientificamente, no que diz respeito à produção de substâncias biologicamente ativas (D'AMICO, et al., 2006, GERDAY, et al., 2000).

## **2. Objetivos:**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Selecionar as leveduras do gênero *Rhodotorulas* do ambiente Antártico para produção de biossurfactante.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- 2.2.1.** Analisar do crescimento celular;
- 2.2.2.** Analisar da produção de biossurfactante;
- 2.2.3.** Avaliar a influência da temperatura e do meio no crescimento dos microrganismos e produção da biomolécula;
- 2.2.4.** Confeccionar a curva de crescimento das leveduras selecionadas;
- 2.2.5.** Caracterizar o biossurfactante produzido.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1. Surfactantes Sintéticos e Biosurfactantes

##### 3.1.1. Surfactantes Químicos

Surfactantes, também chamados de tensoativos, são agentes de atividade superficial, ou seja, compostos capazes de modificar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido -capacidade que reflete sua natureza anfipática- (BRINCK; JÖNSSON; TIBERG, 1998, HARPER, et al., 1991). A parte apolar é frequentemente constituída por uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser: iônica, catiônica -que em solução aquosa possuem cargas positivas e apresentam atividade condicionante e antibacteriana- e aniônica - quando dissolvido apresenta íons com carga negativa, e são amplamente empregados em cosméticos-; não-iônica -devido a sua falta de carga eles podem ser utilizados juntos com os aniônicos ou catiônicos, e são destinados, principalmente, para produtos de uso infantil e para peles sensíveis-; ou anfotérica -exibem um sítio carregado positivo e outro negativamente, a carga dependerá do pH da solução- (DESAI e BANAT, 1997). Um surfactante possui uma estrutura típica R-X, em que R representa a porção hidrofóbica e o X representa a parte polar (PELIZZETTI e PRAMAURO, 1985).

Devido a presença de grupos polares e apolares, os surfactantes tendem a se concentrar na interface de dois líquidos imiscíveis, por exemplo água e óleo, constituindo uma camada, a qual é responsável pela redução da tensão interfacial e superficial BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). O termo interface indica o limite entre dois líquidos imiscíveis, enquanto que, o termo superfície é utilizado quando uma das fases está no estado gasoso (BRINCK; JÖNSSON; TIBERG, 1998). Além dessa propriedade, os tensoativos tendem a formar agregados, denominados micelas, que se formam espontaneamente em certas concentrações de água, propriedade que atribui a capacidade de detergência e solubilização dessas moléculas. Concentração micelar crítica (CMC) é a menor concentração na qual começa a ocorrer a formação das micelas, sendo muito importante para análise do surfactante, quanto menor a CMC, mais eficiente ele é, pois necessita de uma menor quantidade para reduzir a tensão superficial ao máximo (MULLIGAN, 2005, BRINCK; JÖNSSON; TIBERG, 1998). Abaixo da CMC os surfactantes estão, predominantemente, na forma de monômeros; quando está abaixo, porém próximo da CMC, há um equilíbrio entre monômeros e micelas (HINZE e

PRAMAURO, 1993). A CMC varia para cada biomolécula, dependendo da estrutura e das condições experimentais (PELIZZETTI e PRAMAURO, 1985, MESQUITA, 2004).

As características supracitadas fazem com que os surfactantes apresentem diferentes características, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases, o que os torna uma molécula versátil para diversas aplicações (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). De acordo com Banat e colaboradores (2000), a produção mundial de surfactante excedia 3 milhões de t/ano, sendo que grande parte da produção era destinado as indústrias de petróleo, de cosméticos e de produtos de higiene e limpeza, principalmente este último setor (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os surfactantes sintetizados quimicamente são oriundos de petróleo ou fontes de oleoquímico. No entanto, com a atual conscientização da população em relação a preservação do meio ambiente, juntamente com as novas leis de proteção ambiental, alternativas “amigas do ecossistema” tem sido estudada com a finalidade de substituir os surfactantes sintéticos por naturais. Sendo os surfactantes produzidos por microrganismos uma alternativa viável, para a substituição daqueles oriundos do petróleo.

### **3.1.2. Surfactantes Biológicos**

Nos últimos anos tem aumentado o interesse no estudo de surfactantes naturais, que são moléculas produzidas por diferentes organismos vivos; desde plantas (saponinas) até humanos (sais biliares). Denomina-se biossurfactantes àqueles produzidos a partir do metabolismo dos microrganismos (CAMEOTRA e MAKKAR 2004, BOGNOLO, 1999, BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA., 2000).

Em 1949 iniciou-se a utilização de biossurfactantes, quando Jarvis e Johnson descobrem atividades antibióticas e hemolíticas de um ranmolipídeo e, posteriormente, em 1968, Arima e colaboradores descobriram a produção da surfactina, um biossurfactante muito estudado, produzido por *Bacillus subtilis*. Passado algum tempo, estudiosos se depararam com a produção de biossurfactantes em meios hidrofóbicos, o que desencadeou o estudo da utilização de microrganismos produtores de surfactantes, para aplicações relacionadas a tratamento de resíduos oleosos, recuperação de petróleo, e biorremediação de áreas contaminadas (BARROS, et al., 2007).

De forma semelhante aos sintéticos, os surfactantes microbianos são compostos por duas porções distintas, uma lipofília e outra hidrofílica. A apolar, normalmente é composta por

cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, podendo apresentar diferenças estruturais (BOGNOLO, 1999, MAKKAR e CAMEOTRA, 1998).

A principal forma de classificação dos biossurfactantes está relacionado às suas propriedades física-química, sendo separadas em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros, além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (LIN, 1996; DESAI e DESAI, 1993). Os biossurfactantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos diferentes, já os particulados são vesículas e células microbianas com atividade de surfactante (FRIEDMAN e ROSENBERG 1979, KÄPPELI e FINNERTY, 1979). Os surfactantes lipoproteicos são os principais representantes de biomoléculas com atividades antibióticas, antivirais, antitumorais, imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas, tendo como exemplo, surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina.

Os biossurfactantes também podem ser classificados de acordo com a sua massa molecular. Os que apresentam alta massa molecular são representados pelos particulados e poliméricos, exibindo como principal propriedade a capacidade de emulsão, enquanto que os de baixa massa molecular, são constituídos pelos glicolipídeos, lipopeptídeos e ácidos graxos, com capacidade de reduzir a tensão interfacial (ROSENBERG e RON 1997, ROSENBERG e RON, 1999).

Os surfactantes biológicos apresentam algumas funções, como capacidade de aumentar a área superficial de substratos hidrofóbicos tornando-os mais disponíveis e solúveis, possibilitando o crescimento de alguns microrganismos nesses ambientes, influenciam na adesão de microrganismos a superfícies, transportam hidrocarbonetos e possuem atividade antibiótica (COOPER, et al., 1981, LIN, 1996, ROSENBERG e RON, 1999, NITSCHKE e PASTORE, 2002).

### **3.1.2.1. Vantagens e Desvantagens**

A biodegradabilidade e baixa toxicidade são as principais vantagens deles sob os surfactantes sintetizados quimicamente, tornando-os substitutos dos emulsificantes convencionais em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Além dessas aplicações, apresentam um alto potencial em aplicações ambientais, tais como, aumento da recuperação de petróleo e na biorremediação de poluentes insolúveis em água.

Entre outras vantagens apresentadas por essas biomoléculas, encontraram-se, a baixa CMC, melhor desempenho na formação de complexo com metais pesados, formação de

espuma, emulsificação e solubilização. Ainda são estáveis em variações de pH, temperatura e salinidade, são altamente seletivos e específicos, apresentam atividades antimicrobianas, com destaque a atividade antibiótica e apresentam diversidade estrutural que pode estar ligado a propriedades únicas (KIM, et al., 2000, BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000, NITSCHKE e PASTORES, 2002, LIN, 1996).

A principal desvantagem dos surfactantes biológicos frente aos sintéticos é o alto custo de produção. Com o objetivo de contornar essa situação há diversas pesquisas na utilização de substratos mais baratos, como resíduos de agroindustriais, utilização de microrganismos menos exigentes e também no estudo da otimização do processo, para produzir mais com menor gasto (DA ROCHA; HARRISON; JOHNSTON, 1999, GALLERT e WINTER, 2002, RAHMAN, et al., 2002). Outro ponto durante a produção que determina a viabilidade do processo é a extração do biosurfactante produzido, sendo que diferentes métodos podem ser empregados; entretanto em larga escala, a maioria desses métodos demanda grandes volumes de solvente, o que torna o processo caro e gera alta quantidade de resíduos (KIM; RAO.; ANNABLE, 1997, KUYUKINA, et al., 2001).

### **3.1.2.2. Método de Produção**

#### **3.1.2.2.1. Processo Fermentativo**

Muitos produtos comerciais são obtidos por processos fermentativos, que consiste na utilização de fontes de carbono, como a glicose, para geração de energia e algum outro produto, por exemplo o álcool etílico (BARBIERI, et al., 2012). As principais vantagens da utilização dos processos fermentativos para produção de produtos industriais são: obtê-los em qualquer época do ano, menor custo, menos toxicidade em relação a outros surfactantes, possibilidade de produzir com microrganismos utilizando substratos baratos, o espaço utilizado é relativamente pequeno, sendo possível controlar as condições de cultivo (BARBIERI, et al., 2012). Diversos produtos podem ser obtidos por esse método, alguns exemplos são: enzimas, antibióticos, corantes, vitaminas, aminoácidos, biopolímeros, bebidas alcoólicas, entre outros.

Um processo fermentativo pode ser descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987). Os mais comuns na produção de biosurfactante são os por batelada e batelada alimentada, devido a diversas vantagens que esses dois processos apresentam, principalmente em relação a custos de equipamentos,

acompanhamento e manutenção, além de serem mais seguros em relação a condições de assepsia (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987).

Durante o processo de batelada, são adicionados anti-espumante e ácido ou base com o intuito de controlar o pH e nos processos aeróbicos também há adição de oxigênio. Já na batelada alimentada alguns nutrientes são adicionados ao longo do processo, o que leva ao aumento do volume de forma gradual, pois não há descarga. Este último é utilizado principalmente quando o microrganismo é sensível a fenômenos de inibição por substrato, ou repressão catabólica (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987).

Outros aspectos importantes relacionados a condições de fermentação são temperatura, pH, aeração e agitação. A otimização do processo e do meio de cultura utilizado é de grande importância para se obter a máximo rendimento com menor custo, tornando o biossurfactante mais competitivo, economicamente com os surfactantes químicos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

#### **3.1.2.2.1.1. Meio de Cultivo**

O meio de cultivo é muito importante para determinar se o microrganismo será capaz de produzir biossurfactante ou não, além de interferir na estrutura da biomolécula, variando por exemplo a fonte de carbono, esse pode ser alterado modificando também suas propriedades - mudanças podem ser benéficas quando se deseja alguma propriedade específica-. Estudos realizados por Das e colaboradores (2009) demonstrou que utilizando glicose como fonte de carbono, o biossurfactante produzido apresentava atividade antimicrobiana melhor quando comparada com o glicerol, amido e sacarose. Portanto, definir bem a composição do meio é indispensável para se obter uma produção satisfatória.

As fontes de carbono, nitrogênio e a presença de outros compostos, tais como: fósforo, ferro, manganês e magnésio, interferem na cultura do microrganismo. Após definir o meio, as condições de cultivo, temperatura, pH, agitação, aeração também devem ser otimizados para garantir a qualidade e uma alta produção (BANAT, 1995).

Logo, um estudo preliminar das condições de cultivo para os microrganismos utilizados é imprescindível para se obter a máxima produção. Porém, alguns microrganismos só produzem biossurfactantes quando estão em condições de estresse ou quando no meio a compostos lipofílicos (DESAI e BANAT, 1997).

A produção dessas biomoléculas pode ocorrer quando as fontes de carbono são solúveis ou insolúveis em água, porém na literatura há relatos que é preferível uma combinação de

substratos insolúveis em água e carboidratos. A princípio os carboidratos seriam utilizados para gerar a parte polar da molécula de biossurfactante e os compostos lipofílicos para formarem a parte apolar (HOMMEL, et al., 1994).

Apesar do esperado ser o meio de cultura apresentar as duas formas de fonte de carbono, pode acontecer de existir apenas fonte insolúvel ou fonte solúvel. Então, para produzir o biossurfactante há vias metabólicas onde carboidratos originam cadeia de hidrocarbonetos e outras onde hidrocarbonetos são precursores de compostos polares. Se a fonte de carbono é uma glicose, glicerol ou outros compostos hidrofílicos, esses são degradados até originar intermediários da via glicolítica, que são os precursores dos carboidratos constituintes da parte polar do surfactante. Para síntese da parte apolar, a glicose ou glicerol, pela via bioquímica da glicólise, origina acetil-CoA que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo que é o precursor para a síntese dos lipídeos (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987). Porém, quando a fonte de carbono é um hidrocarboneto, as vias bioquímicas utilizadas para originar a parte polar e apolar são a lipolítica e a gliconeogênese, originando ácidos graxos ou sacarídeos, respectivamente. Na gliconeogênese, os ácidos graxos são oxidados, gerando acetil-CoA ou propionil-CoA, a partir destes compostos a via para geração dos precursores do polissacarídeo são o inverso das apresentadas na glicólise. Entretanto, algumas reações são irreversíveis, tais como as catalisadas pelas enzimas piruvato quinase e a fosfofrutoquinase-1, desta forma, outras enzimas são necessárias para reverter tais reações (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987).

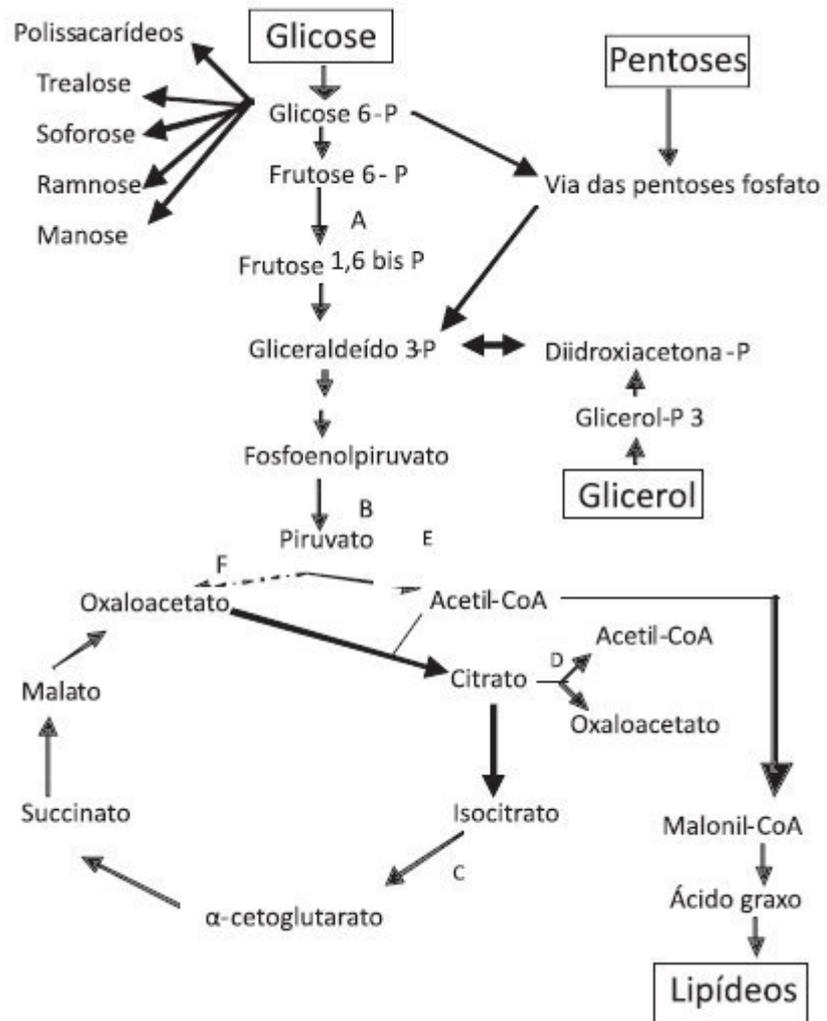


Figura 1: Via sintética das partes polar e apolar do biossurfactante, utilizando carboidratos como fonte de carbono. Enzimas envolvidas: A. fosfofrutoquinase; B. piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato lipase; E. piruvato desidrogenase; F. piruvato carboxilase. Fonte: FONTES; AMARAL; COELHO, 2008.

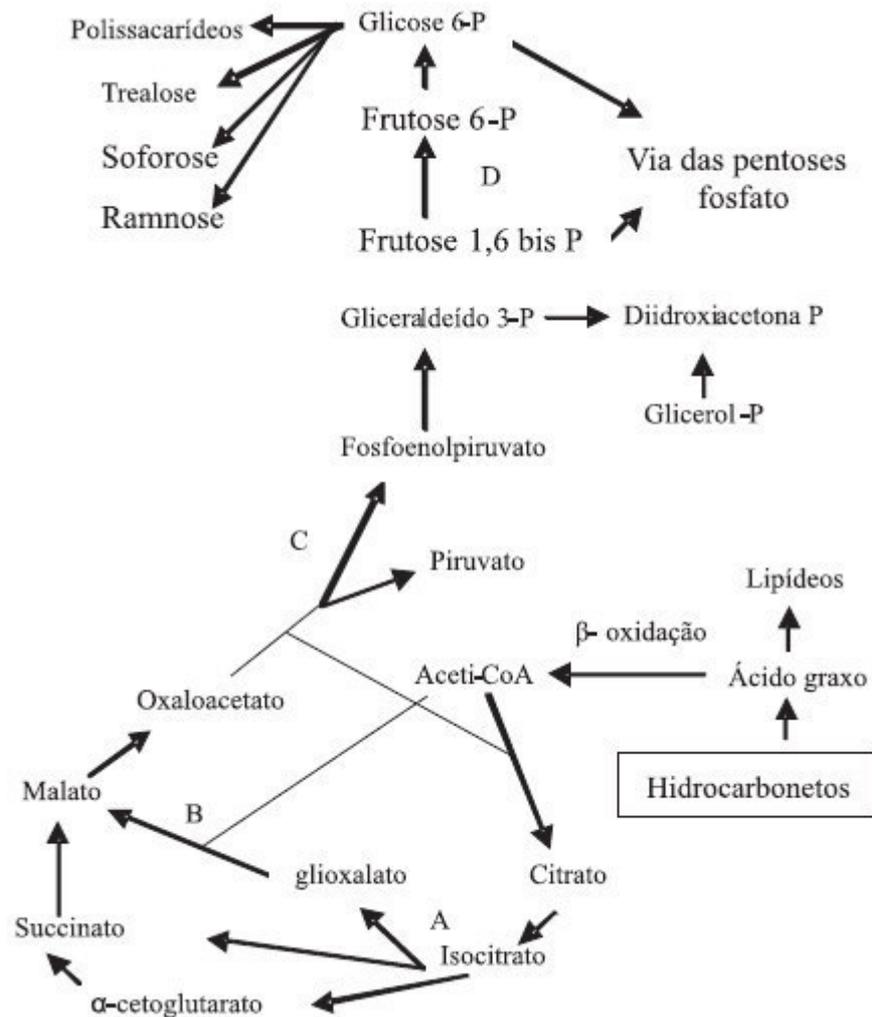


Figura 2: Metabolismo bioquímico para síntese da molécula do surfactante, tendo como fonte de carbono hidrocarbonetos. As enzimas envolvidas são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose-1,6 bifosfatase. Fonte: FONTES; AMARAL; COELHO, 2008.

Outro composto de grande importância na produção de biosurfactante por microrganismos é o nitrogênio, sendo indispensável para o crescimento celular e para síntese de proteínas. A principal fonte de nitrogênio utilizada nas culturas é o extrato de leveduras, porém a quantidade varia de acordo com o microrganismo (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Teóricos afirmam que a produção de biosurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, ou seja, durante a fase estacionária (KITAMOTO, et al., 1993). Albrecht e colaboradores (1996) definiram um mecanismo pelo qual a falta de nitrogênio influencia na produção do surfactante natural. De acordo com eles, a falta gera uma queda na atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ ), enzima

responsável pela oxidação do isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato, levando a um acúmulo de isocitrato e citrato na mitocôndria, esses são transportados para dentro do citosol, onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetil-CoA que é o precursor da síntese de ácido graxo, aumentando a síntese da parte apolar do biossurfactante e conseqüentemente a produção dessa biomolécula.

A relação quantitativa entre as fontes de carbono e nitrogênio é um parâmetro que tornou-se alvo de estudo. Em pesquisa realizada com *Rhodotorula glutinis* utilizando diferentes razões C/N na produção de bioemulsificantes, foi percebido um aumento da emulsificação com o acréscimo da relação C/N, sendo tal dado observado em quantidades limitantes de nitrogênio (ANDRADE, et al., 2006, FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

#### **3.1.2.2.1.2. Resíduos industriais**

Anualmente milhões de toneladas de resíduos danosos ao meio ambiente e saúde da população são gerados, a ideia de tentar utilizar esses resíduos como matéria-prima de processos biotecnológicos apresenta diversas vantagens, entre elas a redução dos custos de produção industrial de biomoléculas e o descarte desses resíduos no meio ambiente (MANEERAT, 2005, PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

A utilização de resíduos agroindustriais que apresentam uma alta quantidade de carboidratos e lipídeos é uma opção adequada para produção de biossurfactantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Esses resíduos podem ser provenientes de diversas atividades industriais, como processamento de batatas, de óleos, de soja, milho, coco, amendoim, canola, entre outros; e detritos domésticos e comerciais, como os óleos de fritura (THOMPSON; FOX; BALA, 2000, MERCADE, et al., 1993, OHNO; ANO; SHODA, 1995, GALLERT e WINTER, 2002).

Thavasi, et al. (2007) produziu biossurfactante utilizando fontes renováveis, baratas e facilmente disponíveis. Testaram três microrganismos e observaram que todos produziram um complexo glicopeptídico capaz de emulsionar diferentes hidrocarbonetos. O principal empecilho na utilização de resíduos para meio de cultivo, está na adequada composição de nutrientes necessários para crescimento dos microrganismos e a formação da biomolécula de interesse. Além disso, gastos com transporte, armazenamento e tratamento prévio pode encarecer o processo, tornando-o pouco atrativo (NITSCHKE e PASTOE, 2003).

### 3.1.2.3. Microrganismos

Os microrganismos produtores de biossurfactante mais estudados são as bactérias e as leveduras. Apesar de vários estudos focarem nas bactérias, algumas espécies são patogênicas o que acarreta na inaplicabilidade dos seus produtos em algumas indústrias (SHEPHERD, et al., 1995). No caso das leveduras, a principal vantagem da utilização delas para produção de biomoléculas está relacionada ao status GRAS (*generally regarded as safe*) que algumas possuem. Esse status GRAS indicam que tal microrganismo não possui toxicidade e patogenicidade, sendo possível a aplicação deles e de seus metabólitos em diversos setores industriais (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

#### 3.1.2.3.1. Leveduras

Os fungos são organismos que conseguiram se adaptar bem as condições do planeta, habitando a Terra há milhões de anos. Podem ser encontrados em diversos locais da natureza, apresentando papéis importantes, como decompositores de matéria orgânica (SCHELL, 1995).

As leveduras geralmente são unicelulares, brancas ou avermelhadas (DE HOOG, et al., 2000), com tamanho variando de 1 a 5 µm de diâmetro e 5 a 30 µm de comprimento; a forma também é diversificada, podendo ser esféricas, elípticas, quase filamentosas. Na sua estrutura apresentam uma membrana citoplasmática lipoproteica, responsável por regular as trocas com o meio externo e possuem uma parede celular rígida. Os núcleos das leveduras são envolvidos por uma membrana, sendo classificadas como células eucarióticas. As formas de reprodução das leveduras podem ser sexuadas ou assexuadas, sendo que a primeira envolve a formação de esporos e a segunda, pode ser por brotamento, divisão binária e a formação de artroconídios (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975).

##### 3.1.2.3.1.1. *Rhodotorula sp.*

As leveduras do gênero *Rhodotorulas* são pertencentes à ordem *Sporidiales* e família *Sporidiobolaceae*. Normalmente as culturas desses fungos demandam de 24 a 48 horas de incubação para serem detectáveis visualmente, apresentam uma coloração amarelada/avermelhada e possuem um aspecto liso e/ou mucoso. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 °C a 37 °C e não são capazes de fermentar carboidratos (KWON-

CHUNG e BENNETT, 1992, FELL e STATZELL-TALLMAN, 2000, DE HOOG, et al., 2000).

Esse gênero apresenta representantes cujas células são leveduriformes ovais, esferoidais ou alongadas com reprodução por brotamento polar ou multilateral, incapazes de produzir esporos, ausência ou formação rudimentar de pseudo-hifa ou hifa e ausência de balistoconídio (FELL e STATZELL-TALLMAN, 2000).

Podem ser isoladas de diferentes ambientes, tais como, solo, água, ar, poeira e substratos comumente encontrados no ambiente humano (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992), e, atualmente, há o aumento do interesse em fungos isolados de diferentes ecossistemas incluindo locais com condições pouco favoráveis, como exemplo, as profundezas do mar, solo e vegetação da Antártica (PAVLOVA, et al., 2001), ambientes aquáticos hipersalinos de alta temperatura, entre outros (BUTINAR, et al., 2005). As *Rhodotorulas* têm-se destacado, para utilização nas indústrias em processos fermentativos, principalmente pela sua alta taxa de crescimento em matéria-prima barata (BRANCO, 2010).

Estudos realizados por Oloke e Glick (2005), utilizando leveduras *Rhodotorula glutinis* demonstrou que o microrganismo produziu bioemulsificante e apresentou níveis de emulsificação significativos em querosene e óleo cru (80%) e também pesquisas relacionadas a remoção de óleo bruto de poluentes, apresentou taxa acima de 76%.

### **3.1.2.3.1.2. Leveduras da Antártica**

Há um crescente interesse em microrganismos provenientes de ambientes extremos, ou seja, microrganismos resistentes a condições climáticas e geográficas. Entre os microrganismos mais estudados encontram-se os fungos, com foco especial nas leveduras, e um dos ambientes de destaque é a Antártica.

O aumento do interesse no estudo da microbiota da Antártica não se restringe apenas no âmbito para novas aplicações biotecnológicas, mas também para colher informações ecológicas e taxonômicas, pois ela ainda não foi exaustivamente estudada, principalmente no estudo de fungos, tanto terrestre quanto marinhos (ROSA, et al., 2010). Além disso, diversos estudos demonstram o interesse na utilização de extremófilos, para aplicações industriais, pois eles apresentam particularidades positivas relacionadas a necessidade de superar as condições desfavoráveis do seu ambiente de origem.

Outros estudos focam nas substâncias bioativas produzidas pelos microrganismos, dentre esses os fungos têm se destacado como fonte rica e promissora de novos produtos

naturais. Devido ao ambiente extremo nos quais eles crescem, eles possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários incomuns, acredita-se que sejam adaptações químicas para competir por substrato ou para defesa (SINGH, et al., 2011, BHADURY; MOHAMMAD; WRIGHT,2006).

A Antártica é um continente que apresenta um conjunto de características que o tornam inóspito para o crescimento de organismo vivos, pois possui o clima mais frio e seco do planeta, mais de 99% do continente está coberto de gelo por longos períodos, baixa temperatura, variando no verão de 15 °C para – 80 °C, no inverno, ventos fortes que ultrapassam a velocidade de 100 km/h, alta sublimação e evaporação, elevada incidência de radiação, principalmente ultra violeta, alternados com prolongados períodos de escuro, baixa disponibilidade de água, o que influencia no crescimento e desenvolvimento de qualquer ser vivo. Apesar de todas essas péssimas condições para sobrevivência de qualquer organismo, a Antártica apresenta uma enorme diversidade biológica (RUISI, et al., 2007, ROSA, et al., 2010, YERGEAU e KOWALCHUK, 2008, ONOFRI, et al., 2007, MARGESIN e MITEVA, 2011).

Microrganismos pertencentes aos domínios Bacteria, Eucarya e Archaea, são capazes de desenvolver mecanismos fisiológicos e metabólicos, para superar as barreiras impostas pelo ambiente, principalmente as baixas temperaturas (RUISI, et al., 2007, BUZZINI, et al., 2012). De maneira geral, os fungos adaptados ao frio podem ser divididos em psicrófilos, que englobam aqueles incapazes de crescer a temperaturas acima de 20 °C, e os facultativos, são os microrganismos que crescem em temperaturas baixas, porém apresentam uma taxa de crescimento mais elevada quando cultivados em temperaturas acima de 20 °C (KIMURA e MORITA, 1975, BRUNATI, et al., 2009, BUZZINI, et al., 2012).

A biota da antártica é constituída por microrganismos que não regulam a temperatura interna, apresentando a mesma temperatura do meio e, apesar do efeito negativo da baixa temperatura nas reações químicas, esses microrganismos conseguem crescer e mover-se em taxas similares aos de ambientes temperados, e a habilidade desses microrganismos crescer e sobreviver nesse ambiente é devido a diversas modificações fisiológicas e moleculares (FENICE, et al., 1997; COWAN e TOW, 2004). Eles apresentam diferentes níveis de adaptações, dentre algumas adaptações desenvolvidas pelos fungos para sobrevivência no continente Antártico destaca-se a presença de micélios estéreis, que seriam uma forma de superar as temperaturas abaixo de zero; a produção de melanina, para contornar o problema relacionado a alta incidência de radiação UV (ROBINSON, 2001); e a produção de vários compostos com o objetivo de protegê-los do congelamento intracelular e reduzir os resultados deletérios da formação de cristais de gelo (MARGESIN e FELL, et al., 2008, SHIVAJI e

PRAKASH, 2010), como exemplo proteínas anticongelantes que, além de reduzir o ponto de fusão da água, também possuem atividade inibitória sobre a recristalização do gelo (GILBERT, et al., 2004, KAWAHARA, 2008). O segredo para sobrevivência em ambientes com baixas temperaturas é a capacidade de contornar os efeitos negativos causados pelas mesmas, adaptando-se funcional e estruturalmente (MARGESIN e MITEVA, 2011).

Alguns estudos com leveduras provenientes da antártica já foram realizados, visando a produção de biossurfactante. Morita e colaboradores (1975) estudaram o efeito do biossurfactante *mannosylerythritol lipidico*, produzido pela levedura *Pseudozyma antarctica*, sobre a hidratação de peles danificadas, e notaram que a aplicação dessas biomoléculas reverteu os danos na pele de forma dose dependente. Evidenciando que leveduras da antártica são capazes de produzir biossurfactantes e apresentam aplicabilidade em diferentes setores industriais, como na área dos cosméticos.

Outro estudo realizado com levedura vinda da Antártica, foi a produção e caracterização do biossurfactante produzido por *Rhodococcus fascians*. Gesheva et al. (2010) descobriu através de teste de cromatografia que o tensoativo é um glicolípido contendo ramnose, capaz de reduzir a tensão superficial da água/ar para 27 mN/m, de inibir o crescimento de *B subtilis* ATCC 6633 e apresentou atividade hemolítica.

### 3.1.3. Propriedades dos Surfactantes

Dentre as principais propriedades dos surfactantes a adsorção, concentração micelar crítica, solubilidade, solubilização de substâncias hidrofóbicas e microemulsão e balanço hidrofílico/lipofílico (HLB) são as que mais se destacam. A seguir será apresentado um breve resumo sobre cada uma, e a relação entre elas.

Adsorção é a capacidade de acumular ou aumentar a concentração de uma determinada substância sobre uma superfície de um outro composto. Pode ocorrer separação preferencial de uma substância contida numa fase líquida ou gasosa. Graças a característica anfipática do surfactante, esse se acumula na superfície de líquidos e dependendo da sua concentração se distribui de forma desordenada ou ordenada (PORTER, 1994).

Quando a concentração do surfactante está baixa, as moléculas tendem a se distribuir na superfície paralelamente, com o aumento da concentração essas moléculas se organizam de modo a formar uma camada unidirecional, quando isto acontece encontra-se a CMC (PORTER, 1994). A CMC é a propriedade que define em qual concentração de surfactante inicia a formação das micelas, portanto, abaixo da CMC os surfactantes estão, preferencialmente, na

forma de moléculas individuais e, acima do CMC há um equilíbrio entre monômeros e micelas (BOGNOLO, 1999). Quando a solução é polar, as micelas formadas apresentam a parte hidrofóbica do surfactante voltadas para o centro, sendo chamadas de micelas diretas, enquanto na solução apolar os núcleos das micelas são formados pela parte hidrofílica do surfactante, caracterizando as micelas inversas. A CMC é influenciada por diversos fatores, tais como: estrutura do tensoativo -quanto maior a parte hidrofóbica menor a CMC-, temperatura, pH, presença de eletrólitos e compostos orgânicos (MESQUITA, 2004).

Outra propriedade muito importante dos surfactantes é a solubilidade, sendo que essa está relacionada ao tamanho das cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas que compõe a molécula. Permanecendo constante o tamanho da parte polar, a ampliação do grupo hidrofóbico reduz a solubilidade na água, já mantendo o tamanho da cadeia de hidrocarbonetos e aumentando o grupo hidrofílico, o surfactante fica mais solúvel na água. A temperatura também influencia na solubilização dos surfactantes na água, sendo que em temperaturas muito baixas estarão, principalmente, na forma cristalina insolúvel e com o aumento da temperatura a solubilidade também aumenta.

Quando a concentração de surfactantes solubilizados no solvente atinge a CMC, a temperatura na qual ele se encontra é denominada temperatura micelar crítica (TMC) e, é nesta temperatura em que as três fases (cristalina, monômero e micelar), encontram-se em equilíbrio (BHAIRI, 2001). O ponto de turvação é uma temperatura que precisa ser conhecida, pois influencia nas aplicações de surfactantes não iônicos ou anfóteros, sendo a temperatura na qual a solução contendo estes surfactantes torna-se turva (NASCENTES; ARRUDA; MANIASSO, 2002).

Substâncias orgânicas que são insolúveis ou pouco solúveis em água podem ser solubilizados pela adição de surfactantes, esta capacidade está relacionada a formação de micelas, pois essas substâncias podem ser incorporadas em seu interior (PORTER, 1994, MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). Para que líquidos imiscíveis se misturem é necessária uma grande quantidade de surfactante na solução, algumas vezes há formação de microemulsão, que corresponde a uma solução, de compostos orgânicos em água aparentemente límpida e estável (PORTER, 1994).

O HLB corresponde a relação entre as partes hidrofílicas e hidrofóbicas da molécula. Ele altera com o aumento no caráter hidrofílico, ou seja, quanto mais hidrofílico a molécula maior o valor de HLB, e quanto mais hidrofóbico menor este valor. O valor é importante principalmente para determinar aplicações para o surfactante estudado, pois afeta as propriedades físico-químicas (HELENIUS e SIMONS, 1975).

### 3.1.4. Propriedades Específicas dos Biossurfactantes

Os surfactantes reduzem a atividade superficial e interfacial, porém quando compara os surfactantes convencionais com os produzidos a partir dos microrganismos, nota-se que esses são mais efetivos, pois necessitam de uma menor quantidade de biossurfactante para reduzir a tensão superficial (COOPER e PADDOK, 1984, BANAT, 1995, MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes são estáveis a uma ampla faixa de temperatura, pH e suportam altas concentrações de NaCl, sendo uma propriedade de enorme interesse para aplicações industriais, enquanto que os surfactantes químicos são mais susceptíveis a variações drásticas, ficando inativos (HOROWITZ; GILBERT; GRIFFIN, 1990, ROCHA, et al., 1992, BOGNOLO, 1999, LIN, 1996).

Além de estabilidade e melhor desempenho das propriedades, os surfactantes naturais são biodegradáveis, biocompatíveis e apresentam baixa toxicidade. Graças a essas propriedades o interesse da população nessas biomoléculas aumentou, principalmente pela preocupação da aplicação delas em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, e também pela conscientização da preservação ambiental (MULLIGAN e GIBBS, 1993, FLASZ, et al., 1998, NITSCHKE e PASTORE, 2002).

### 3.1.5. Aplicações

Devido às suas propriedades, os surfactantes apresentam uma ampla aplicação nos setores industriais, agrícolas e ambientais. Dentro do ramo industrial são aplicados principalmente nas indústrias de produtos de limpeza e de higiene e nas indústrias petrolíferas (CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, 1998, BOGNOLO, 1999). Podem ser utilizados na recuperação de áreas contaminadas com uma técnica biológica, chamada biorremediação. A biorremediação utiliza organismos vivos ou as suas enzimas para remover, reduzir ou neutralizar poluentes orgânicos e inorgânicos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005). A molécula de biossurfactante seria produzida pelos microrganismos presentes no local contaminado, ou por microrganismos adicionados ou ainda produzida *ex situ* e depois adicionados na área, com o intuito de tornar biodisponível o poluente para degradação pelos microrganismos (ALEXANDER, 1999, GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Os surfactantes também podem ser empregados na limpeza de reservatórios de óleos, recuperação melhorada do petróleo (MEOR), aplicações terapêuticas como antibióticos, antivirais, antifúngicos e antitumorais, utilizados nas formulações de herbicidas e pesticidas,

apresentam aplicações na mineração para flotação e separação de alguns minerais. Como dito anteriormente, a grande porcentagem da produção do surfactante é utilizada nas indústrias de produtos de limpeza e higiene, são também importantes nas indústrias de alimentos, de papel, têxtil, de cerâmica e também de cosméticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002, BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Das e colaboradores (2008) relataram que frações lipopetídicas do biossurfactante produzido por *B. circulans* tem ação antimicrobiana. Semelhante a Mukherjee et al. (2009) estudando *B. circulans* marinhos, purificou um biossurfactante com atividade antimicrobiana. Esses estudos comprovam a possibilidade da aplicação desses tensoativos em quimioterapia antimicrobiana. Em relação a outras aplicações, diversos estudos envolvendo remoção de metais pesados foram realizados, dentre eles Das e outros autores, em 2009, observou que biossurfactantes concentrados com baixo CMC removeu 100 ppm de chumbo e cádmio.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Microrganismos

As leveduras da Antártica vieram da coleção de culturas da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/Unicamp), composta por 100 isolados de diferentes ambientes antárticos, tanto terrestres quanto marinhos. No presente estudo, quatro dessas leveduras foram analisadas, sendo elas codificadas como L69, L87, L104 e L106, todas pertencentes ao mesmo gênero *Rhodotorulas* (DUARTE, et al., 2013).

Os microrganismos foram preservados em frascos de penicilina, a -10 °C, contendo miçangas de vidro, meio padrão de levedura (g/L) (extrato de levedura, 3.0; peptona, 5.0; glicose, 20.0) e glicerol a 50 % (v/v). Cada frasco foi inoculado a partir da mesma cultura inicial e continha em média 25 miçangas de vidro, possibilitando assim, a utilização da mesma geração de células ao longo de todo estudo. Abaixo na tabela 1, encontra-se a espécie a qual corresponde cada código:

Tabela 1: Identificação das leveduras foco de estudo do presente trabalho.

<b>Código</b> <b>Linhagem</b>	<b>Substrato de</b> <b>origem</b>	<b>Espécie</b>	
<b>L69</b>	-	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>
<b>L87</b>	Liquen 2	<i>Rhodotorula laryngis</i>	<i>Basidiomycota</i>
<b>L104</b>	Pedra com liquen	<i>Rhodotorula laryngis</i>	<i>Basidiomycota</i>
<b>L106</b>	Pedra com liquen	<i>Rhodotorula glacialis</i>	<i>Basidiomycota</i>

### 4.2. Meios testados

Três meios líquidos foram testados. O meio A era composto (g/L): extrato de levedura, 3.0; peptona, 5.0; glicose, 20.0. O meio B (g/L): extrato de levedura, 3.0; glicose, 50.0; NH<sub>4</sub>Cl, 4.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1.0; NaCl, 0.1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5; óleo de oliva, 50.0. Meio C (g/L): extrato de leveduras, 3.0; peptona, 5.0; glicose, 20.0; óleo de Olívia, 20.0.

### **4.3. Condições de cultura e Materiais**

Todas as fermentações foram realizadas em modo batelada, durante 5 dias (120h), em shaker com agitação de 120 rpm. Foram testadas duas temperaturas diferentes, sendo elas: 15 e 30 °C.

Em relação aos materiais utilizados para posteriores análises, incluem: óleo de soja, óleo de motor, óleo diesel e querosene, o primeiro obtido em supermercado e os demais em posto de abastecimento local; demais reagentes adquiridos no laboratório.

### **4.4. Preparo das Amostras**

Para as posteriores análises realizadas, 30 mL do caldo fermentativo foi centrifugado (8000 g por 20 minutos), com o intuito de separar as células da solução aquosa. A suspensão foi armazenada em seis frascos de penicilina, contendo 5 mL cada.

### **4.5. Massa Seca**

Após o procedimento mencionado anteriormente, o corpo de fundo foi diluído em água destilada e posto para secar, durante 24 horas, na estufa a 100 °C em placas de petri. O resultado da massa seca foi obtido pela diferença do peso da placa de petri após a adição do pellet diluído e seco e a placa de petri antes da adição do corpo de fundo.

### **4.6. Consumo de Glicose**

Para o ensaio de consumo de glicose, utilizou o kit Glicose Liquiform (Labtest) que detecta a glicose no meio, através de reações catalisadas por um sistema enzimático. Pelas reações obtém-se um composto de coloração avermelhada que pode ser lido no espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 510 nm.

A primeira reação que ocorre é a oxidação da glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, pela glicose oxidase; o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonímia vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

A metodologia seguida foi indicada pelo fabricante com algumas modificações. Antes da leitura realizou-se diluições, de acordo com a quantidade remanescente de glicose no meio, posterior as diluições, foi misturado 1 ml da solução diluída com 1 ml do Glicose Liquiform, incubando em banho no termociclador, a 37 °C, por 10 minutos. O branco, para calibragem, foi feito com água destilada e submetido aos processos da mesma forma que as amostras. Após a incubação realizou a leitura no espectrofotômetro.

#### 4.7. Atividade de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado a partir da metodologia descrita por Cai, et al. (2014), a qual consiste na mistura de solução aquosa livre de células do caldo fermentativo com o querosene, óleo diesel, óleo de soja ou óleo de motor, na proporção de 1:1. A mistura foi agitada vigorosamente num vortex durante dois minutos à temperatura ambiente e deixada em repouso por 24 horas. A taxa de emulsificação foi calculada pela divisão da altura da parte emulsificada pela altura total e a razão multiplicada por 100 (para obter o resultado em porcentagem), como demonstrado na equação abaixo (1):

$$\% = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}} \quad (1)$$

#### 4.8. Tensão Superficial

Para análise da tensão superficial, utilizou-se 10 ml da amostra da solução aquosa livre de células do caldo fermentativo. O método utilizado foi o do anel de du Noüy (1925), com o tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Humburgo, Alemanha), à temperatura ambiente. Concomitantemente a análise da amostra foi realizada a tensão do álcool etílico com o intuito de calibrar, realizando posteriormente uma divisão do valor padrão pelo valor real, razão multiplicada com o valor da tensão obtida da amostra.

#### 4.9. Colapso da gota

Para análise do colapso da gota foi utilizada a metodologia modificada de Bodour e Miller-Maier (1998). A técnica foi realizada utilizando placa de cultura celular de 96 poços. Dentro dos poços foram adicionados o sobrenadante da cultura e, em seguida, adicionada uma

gota de óleo de soja. Resultados positivos para produção de biossurfactante, consistia na observação do colapso da gota. Os testes foram realizados em duplicatas.

#### **4.10. Espalhamento da gota**

Nesta técnica 10 ml de água destilada foi adicionada em placas de Petri, seguida da adição de 1 ml de óleo de soja e posterior adição de uma gota do sobrenadante da cultura sobre a superfície do óleo. Se o óleo mantivesse o formato, o resultado era marcado como negativo, caso espalhado, classificado como positivo, sendo que o meio fermentado possuía ação biossurfactante em sua composição (modificado SILVA, et al., 2014).

#### **4.11. Teste de Estabilidade**

A estabilidade dos biossurfactantes produzidos foram avaliadas sob diferentes estresses, variando temperatura, pH e salinidade (DUBEY, et al., 2012). Para análise, os sobrenadantes contendo os diferentes biossurfactantes foram submetidos aos estresses por 15 minutos, antes de realizar o teste de índice de emulsificação em duplicata, por meio do uso do querosene. No teste de estabilidade térmica, as amostras foram submetidas a variação das temperaturas (°C), 20, 40, 60, 80 e 100, em banho no termociclador. Na análise da estabilidade em relação ao pH, utilizou-se hidróxido de sódio e ácido clorídrico para regular o pH das amostras em: 4, 6, 8, 10 e 12; o teste frente à estabilidade salina, utilizou-se soluções de cloreto de sódio (NaCl) nas seguintes concentrações (g/L), 5, 15, 20, 50 e 100.

#### **4.12. Concentração Micelar Crítica (CMC)**

Para determinar a concentração micelar crítica, empregou-se a medição da tensão superficial, utilizando uma técnica descrita por Desai e Banat (1997), denominada diluição micelar crítica (CDM). Quando a concentração do surfactante é maior que a CMC, a tensão superficial se mantém constante num valor mínimo, porém quando esta concentração está abaixo da CMC, a tensão superficial aumenta. Nesse ensaio o caldo fermentado livre de células foi concentrado através do método de liofilização e diluído em diferentes concentrações pela adição de água destilada, a tensão superficial foi determinada para cada diluição.

#### **4.13. Purificação do biossurfactante produzido**

Para purificação um litro do meio de cultura foi centrifugado a 8000 g por 20 min e, posterior a esse preparo da amostra, o pH do sobrenatante foi ajustado para dois utilizando HCl 6,0 M. Paralelamente, foi preparada uma solução de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (Clorofórmio/Metanol) na proporção 2:1. O sobrenadante com o pH ajustado foi misturado com a solução de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ , (1:1) e, deixou-se agitar vigorosamente por 15 minutos. Após a agitação aguardou-se a separação das fases, sendo a fase orgânica removida e a operação foi repetida duas vezes. O produto foi concentrado a partir das fases orgânicas reunidas, utilizando um rotaevaporador. No final, foi obtido um produto amarelado e viscoso, que foi diluído em metanol e concentrado outra vez por evaporação do solvente em estufa, a 45 °C (SILVA, et al., 2010).

#### **4.14. Análise infravermelho**

Os biossurfactantes previamente purificados pela metodologia descrita acima, foram analisados por espectroscopia infravermelha, através da técnica de disco prensado de KBr, utilizando o equipamento IRPrestige-21 (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer), marca SHIMADZU e, o software Irsolution. Os dados foram processados pelo programa Origin pro, para a plotagem dos gráficos.

## 5. Resultados e Discussão

No presente trabalho, quatro leveduras do gênero *Rhodotorulas* foram submetidas a diversos testes para confirmar a produção do surfactante biológico e a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas. A escolha das duas temperaturas estudadas (15 e 30 °C) foi com a intenção de analisar o desempenho das leveduras em uma temperatura, praticamente ambiente da região sudeste do Brasil, e uma temperatura mais amena, considerando que são leveduras provenientes de clima frio.

Após os estudos preliminares, duas leveduras foram selecionadas por apresentarem melhor desempenho, usando como critério o índice de emulsificação em querosene e os testes de colapso e espalhamento da gota. Posteriormente, estudos a respeito da estrutura e cinética da produção do biosurfactante por essas duas leveduras foram aprofundados, com o intuito de melhor caracterização da biomolécula e otimização da produção.

Abaixo estão representados os resultados obtidos durante as análises experimentais.

### 5.1. Análise do crescimento celular

Na tabela 2 estão os resultados referentes aos experimentos com o intuito de comprovar o crescimento dos microrganismos nos meios testados, através do teste de massa seca e consumo de glicose.

*Tabela 2: Resultados da análise de massa seca, presença/ausência de corpo de fundo e consumo de glicose.*

Leveduras	L69		L87		L104		L106	
	15	30	15	30	15	30	15	30
Massa Seca (g/l)	2,13	2,23	0,55	0,76	0,91	0,53	0,61	2,86
Corpo de Fundo	S	S	S	S	S	S	S	S
Glicose (g/L)	0,12	0	17,01	13,35	10,89	13,08	10,02	0

S presença de corpo de fundo.

N ausência de corpo de fundo.

Na tabela 2 estão representados os dados das leveduras L69, L87, L104 e L106, em relação ao crescimento celular e consumo da glicose, nas temperaturas testadas. Todas foram capazes de crescer em ambas temperaturas, apresentando uma correlação entre o crescimento

e o consumo de glicose, quanto melhor o crescimento menor a concentração de glicose restante.

Percebe-se que as leveduras que cresceram mais, L69 a 15 e 30 °C, 2,13 e 2,23 g/L, respectivamente e, L106 a 30 °C com 2,86 g/L, apresentou consumo de glicose com valores próximos ou iguais a zero, 0,12, 0 e 0 g/L. As leveduras L87 e L104 apresentaram valores baixos de crescimento nas duas temperaturas com 0,55, 0,76, 0,91 e 0,53 g/L; e a glicose foi pouco utilizada permanecendo com valores altos, comparada a concentração inicial de 20 g/L, 17,01, 13,35, 10,89 e 13,08 g/L.

Em relação ao melhor crescimento em uma temperatura ou outra, quase todas as leveduras obtiveram resultados similares, não interferindo a temperatura na sua taxa de crescimento, exceto a L106, que evidentemente, prefere a temperatura de 30°C, sendo significativa a diferença no desenvolvimento, com 0,61 e 2,86 g/L, a 15 e 30 °C, nesta ordem.

## **5.2. Análise da produção de biosurfactante**

Os testes representados na tabela 3 e nas figuras 3 e 4 foram realizados para analisar presença ou ausência da biomolécula de interesse. Os experimentos de índice de emulsificação e tensão superficial são quantitativos, enquanto os de colapso e espalhamento da gota são qualitativos. As análises foram realizadas nas duas temperaturas estudadas.

Tabela 3: Resultados da análise de índice de emulsificação, colapso e espalhamento da gota e tensão superficial.

Leveduras		L69		L87		L104		L106	
Temperatura (°C)		15	30	15	30	15	30	15	30
Índice de Emulsificação (%)	Óleo de soja	100	100	100	100	100	100	100	100
	Óleo diesel	0	0	0	0	0	0	0	100
	Óleo de motor	100	96	100	98	96	96	98	100
	Querosene	89	98	0	0	94	78	0	81
Colapso da gota		S	S	N	N	N	N	N	S
Espalhamento da gota		S	N	S	N	S	S	N	N
Tensão superficial (mN.m <sup>-1</sup> )		51,23	51,24	49,25	49,62	49,13	45,2	49,27	44,68

Ao observar a tabela 3, em relação aos dois testes qualitativos, nota-se que a levedura L69 apresentou os melhores resultados, sendo positiva para os testes colapso da gota, em ambas temperaturas e, na temperatura de 15 °C, para o teste espalhamento da gota. Em seguida, a levedura L104, foi aquela com melhor desempenho, apresentando resultados positivos, nas duas temperaturas testadas, no teste espalhamento da gota. As demais leveduras, L87 e L106, apresentaram apenas um teste positivo. Na L87, foi positiva na temperatura 15 °C no teste espalhamento da gota e, a L106 foi positiva a 30 °C, para colapso da gota. Ambos os testes foram realizados em duplicatas com o intuito de reduzir o erro experimental, visto que são testes mais sujeitos a erros humanos por serem análises qualitativas.

Abaixo, representados pelas figuras 3 e 4, estão as análises quantitativas do biossurfactante, índice de emulsificação e tensão superficial. A levedura L87, foi a que apresentou pior desempenho, sendo capaz de emulsificar apenas dois óleos, óleo de soja e óleo de motor, 100, 100, 100 e 98%, a 15 e 30 °C, respectivamente. As leveduras L69 e L104 apresentaram resultados semelhantes, nas duas temperaturas testadas, emulsificando óleo de soja, óleo de motor e querosene. Os valores apresentados para L69 foram: 100, 100 e 89%, respectivamente, para temperatura 15 °C e, 100, 96 e 98% para 30 °C. Os resultados da L104,

a 15 °C, 100, 96 e 94%, para óleo de soja, óleo de motor e querosene e, para 30 °C, 100, 96 e 78%, nesta ordem. A única levedura que foi capaz de emulsificar óleo diesel, foi a L106, a 30 °C, emulsificando os quatro óleos testados nesta temperatura, 100, 100, 100 e 81%, para óleo de soja, motor, querosene e diesel, respectivamente. Porém, o desempenho na temperatura 15 °C, foi inferior, apresentando emulsificação, 100 e 98%, para óleo de soja e motor.

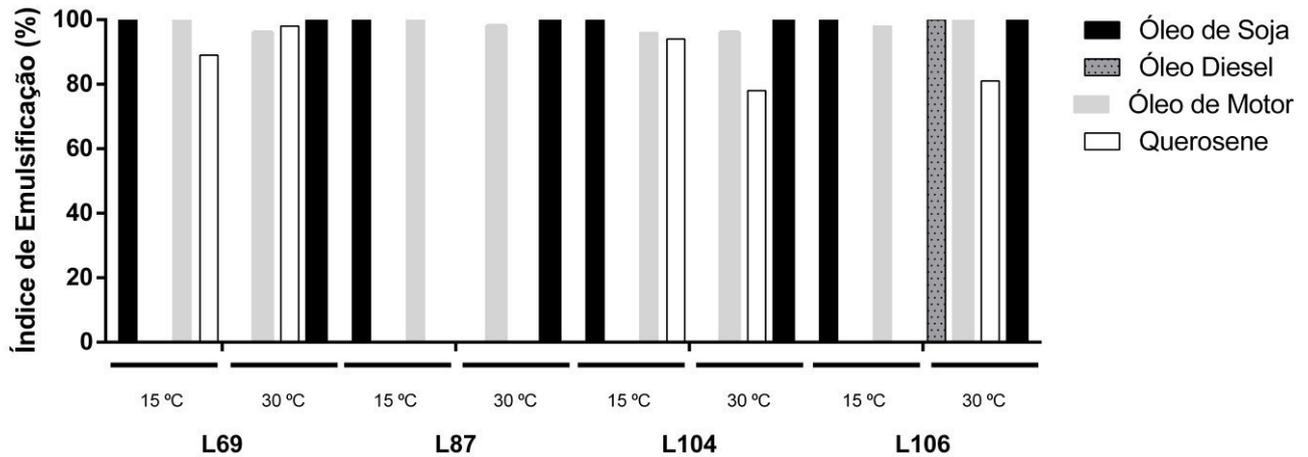


Figura 3: Índice de Emulsificação (%) nos diferentes óleos testados.

Abaixo a figura 4 representando os valores obtidos das tensões superficiais de cada levedura nas temperaturas testadas. As tensões superficiais de todas as leveduras permaneceram praticamente inalteradas. As leveduras L69 e L87, não apresentaram nenhuma diferença de uma temperatura para outra, obtendo 51,23 e 51,24  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , para a levedura L69 a 15 e 30 °C e, 49,25 e 49,62  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , para a levedura L87. As leveduras L104 e L106 apresentaram valores inferiores a 30 °C quando comparadas a 15 °C. Os valores obtidos para L104, foram, 49,13 e 45,2 e, para a L106, 49,27 e 44,68  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Apesar de pequena a redução, foi considerado que houve alteração da tensão superficial do meio, considerando que inicialmente o meio apresenta tensão de aproximadamente 60  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , fato que evidenciou a capacidade do biossurfactante produzido em reduzir a tensão.

Cai, et al. (2014) avaliaram substâncias isoladas para a atividade biossurfactante, caracterizando a tensão superficial e o índice de emulsificação. Os seus resultados mostraram

que a diminuição da tensão superficial e a capacidade emulsificante não foram necessariamente correlacionados semelhante com os dados apresentados acima.

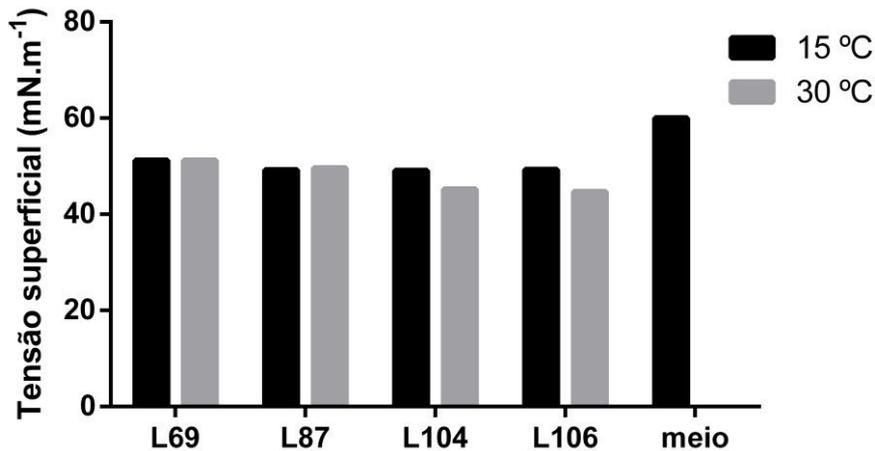


Figura 4: Tensão superficial (mN.m<sup>-1</sup>).

Os resultados dos testes de índice de emulsificação, colapso e espalhamento da gota, demonstraram que as leveduras testadas são capazes de produzir biossurfactantes. De acordo com Beal e Betts (2000), o índice de emulsificação é um teste válido para confirmar a produção do biotensioativo, visto que já é conhecido que estas biomoléculas são capazes de modificar a hidrofobicidade da superfície celular e promove a emulsão ou solubilização de soluções de óleo que anteriormente seriam imiscíveis.

Comparando os testes de emulsificação e de tensão pode-se ter uma ideia de que os biossurfactantes provenientes das *Rhodotorulas* são de alto peso molecular, com principal propriedade a emulsão, justificando os resultados praticamente inalterados da tensão superficial (ROSENBERG e RON, 1999). Com esses testes também foi possível selecionar, a partir das quatro leveduras estudadas, as duas com melhor desempenho. O principal critério para a seleção foi a emulsificação em querosene, em ambas temperaturas, visto que este óleo é o mais utilizado na literatura. Portanto, a partir dos resultados as leveduras L69 e L104 foram as que apresentaram melhor desempenho, sendo escolhidas para as demais análises.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por Singh e Tripathi (2013), que estudaram a produção de um rhamnolipídio pela bactéria *Pseudomonas stutzeri*, isolada a partir da água de formação da camada de carvão de Jharia, induzida por carvão. A produção de biossurfactante foi analisada pelo índice de emulsificação e tensão superficial. A redução da tensão superficial foi de 47 mN.m<sup>-1</sup> e a do controle foi 58 mN.m<sup>-1</sup>, em relação ao índice de

emulsificação foi de 100% para o meio de cultura e 15% para o controle. Ambos resultados demonstram a produção do biossurfactante por esta bactéria.

### 5.3. Avaliação da influência do meio no crescimento dos microrganismos e produção da biomolécula

As leveduras L69 e L104, previamente selecionadas pelos experimentos realizados anteriormente, foram submetidas a três diferentes meios, nomeados como meio A (específico para leveduras), meio B e C, os dois últimos com presença de óleo de oliva. Como citado na literatura, o balanceamento entre fontes de carbonos solúveis e insolúveis em água pode influenciar na produção do biossurfactante, facilitando a formação da parte polar e apolar da biomolécula, aumentando a produção desse (WEI; CHOU; CHANG, 2005). Baseado nisso, foi decidido analisar o desempenho das leveduras nos diferentes meios. Abaixo os resultados dos testes de crescimento para os meios B e C, tabela 4 e os do meio A estão na tabela 2.

*Tabela 4: Resultados da análise de massa seca, presença/ausência de corpo de fundo e consumo de glicose para o meio B.*

Leveduras	L69				L104			
	Meio B		Meio C		Meio B		Meio C	
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
<b>Massa Seca (g/l)</b>	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>Corpo de Fundo</b>	S (++)	S (++)	S (++)	S (+++)	S (+)	S (+)	S (++)	S (++)
<b>Glicose (g/L)</b>	12,6	0,33	0,81	4,74	46,86	43,56	14,04	12,57

S presença de corpo de fundo.

(+) pouco

(++) razoável

(+++) muito

N ausência de corpo de fundo.

--- Não foi possível obter resultados para este teste.

Primeiramente, realizou-se análises com o intuito de confirmar se as leveduras foram capazes de crescer nos meios. O teste de massa seca do meio A está representado na tabela 2 e,

foi possível observar que ambas leveduras se desenvolveram nas duas temperaturas testadas, porém a L69 cresceu mais, consumindo mais glicose. No meio B e C, tabela 4, como continham óleo não foi possível fazer análise de massa seca, portanto a confirmação de crescimento foi feita pela presença de corpo de fundo e consumo de glicose. Comparando a L69 com a L104, como no meio A, a L69 cresceu muito mais, consumindo mais glicose.

Na L104, a alta quantidade de glicose remanescente no meio B, 46,86 e 43,56 g/L nas temperaturas 15 e 30 °C respectivamente; por esse meio receber uma maior quantidade de glicose (50 g/L), enquanto que o meio C, 14,04 e 12,57 g/L, recebeu apenas 20 g/L. Tal fato demonstra que o consumo de fonte de carbono por essa levedura, foi praticamente o mesmo nos dois meios testados.

Comparando o desenvolvimento de cada levedura nos três meios testados, o crescimento delas não foi alterado quanto a variação da composição do caldo fermentativo, portanto, apesar de diferentes composições as leveduras se adequaram bem em todos os três meios, permitindo a utilização destes para seu crescimento.

*Tabela 5: Resultados da análise de índice de emulsificação em querosene nos diferentes meios testados.*

Leveduras		L69		L104	
Temperatura (°C)		15	30	15	30
Índice de Emulsificação em Querosene (%)	Meio A	89	98	94	78
	Meio B	96	100	40	73
	Meio C	96	66	56	42

Com o objetivo de confirmar a produção de biossurfactante o teste de índice de emulsificação em querosene, foi realizado. Para a levedura L69 a 15 °C, não houve grande variação de um meio para outro com, 89, 96 e 96% para os meios A, B e C, respectivamente. Na temperatura de 30 °C os meios A e B, 98 e 100%, ficaram com valores praticamente iguais, porém no meio C o desempenho foi apenas de 66%, significativamente inferior aos outros dois.

Na L104, em ambas temperaturas o meio A apresentou melhor desempenho, porém na temperatura 15 °C foi significativamente melhor, com 94%, comparado a 78% a 30 °C. Nos demais meios B e C os valores foram abaixo de 60%, com exceção do meio B a 30 °C, com 73%. É de conhecimento geral que um índice de emulsificação significativo é igual ou acima de 60% (BHARALI, et al., 2011), portanto o meio C em ambas temperaturas e o meio B a 15 °C, não apresentaram resultados significativos, não sendo possível confirmar que nesses meios

e nessas temperaturas a L104 conseguiu produzir o surfactante. Abaixo a figura 5 demonstra os resultados do índice de emulsificação em querosene para os três meios nas duas temperaturas.

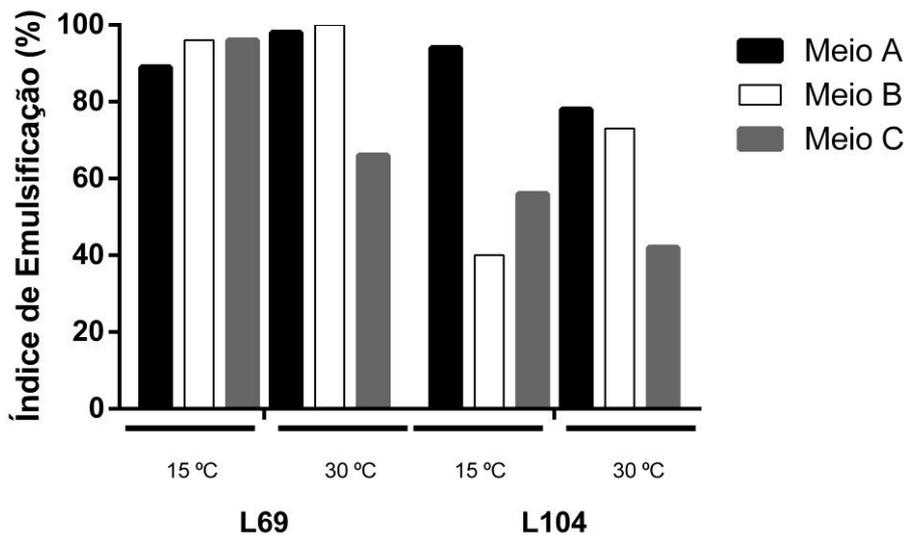


Figura 5: Índice de Emulsificação em Querosene (%) nos diferentes meios testados.

Esses resultados podem confirmar que a adição de óleo não melhorou a produção do biosurfactante e, em alguns casos interferiu de forma negativa, como na L104 a 15 °C, meio B e C e a 30 °C o meio C. Devido ao fato dos meios alternativos não produzirem efeitos favoráveis com o intuito de aumentar a produção da biomolécula, nos demais experimentos permaneceu a utilização do meio específico para leveduras, denominado meio A.

Bednarski, et al. (2004) estudaram a produção de biosurfactante por duas espécies de candida, *Candida antarctica* e *Candida apicola*, com suplementação do meio com borra de refino e, contraditoriamente aos resultados do presente trabalho, a suplementação do meio de cultura obteve um efeito positivo na eficiência da síntese de glicolipídios e no crescimento. O aumento da eficiência da síntese de glicolipídios pela levedura foi de 7,5 a 8,3 vezes maior no meio suplementado quando comparado ao meio não suplementado. Também foi avaliado a influência da adição de ácidos graxos de pós-refinaria, que aumentaram a produção de glicolipídios pelas duas candidas estudadas, de forma similar que a borra de refino.

Singh e Tripathi (2013), que estudaram a produção de um rhamnolipídio pela bactéria *Pseudomonas stutzeri* e, realizaram testes para analisar a influência da presença de hidrocarbonetos no meio, semelhante ao trabalho citado anteriormente e o presente. Testaram meio suplementado com carvão bruto e oxidado, azeite de oliva, óleo de soja, querosene, diesel e naftaleno. Ocorreu a produção em todos os meios, sendo melhor nos suplementados com carvão (bruto ou oxidado) e menor quantidade pelo naftaleno. Analisando a capacidade de

emulsão do surfactante produzido, utilizaram uma quantidade padrão do rhamnolipídio (1 mg/L) e notou-se que os provenientes do meio contendo carvão atingiu a máxima emulsão, de 75%, demonstrando uma maior eficiência por estas biomoléculas, quando comparadas as outras. Os resultados confirmam que o surfactante da bactéria *P. Stutzeri* são específicas para carvão. A bactéria termófila *Alcaligenes faecalis* apresentou crescimento e produção de biosurfactante em todas as fontes de carbono testadas, porém, o rendimento do biotensoativo foi mais elevada em meio suplementado com 2% (v/v) de diesel (BHARALI, et al., 2011).

Silva e colaboradores (2014), estudaram quatro espécies de *Pseudomonas* em diferentes substratos para análise da redução da tensão superficial do meio. O melhor resultado foi obtido por *P. cepacia* cultivada no meio suplementado com resíduo de óleo de fritura e milhocina. Confirmando que a adição de uma fonte de carbono insolúvel em água, pode influencia favoravelmente a produção do surfactante, por estes microrganismos.

#### **5.4. Curva de Crescimento das leveduras L69 e L104**

Os testes efetuados para obter a curva de crescimento das leveduras L69 e L104, foram divididos em duas análises importantes: crescimento microbiano e produção da biomolécula. Os experimentos de massa seca e consumo de glicose fornecem informações a respeito da cinética celular, enquanto que, os de índice de emulsificação e tensão superficial, geram dados que confirmam ou não a produção do biosurfactante, molécula de interesse do presente trabalho. Tais dados foram coletados durante 120 horas (cinco dias), com exceção da massa seca que foi analisada durante 112 horas, com intervalos de 8 em 8 horas e, estão representados abaixo por tabelas e figuras.

### 5.4.1. Análise de massa seca

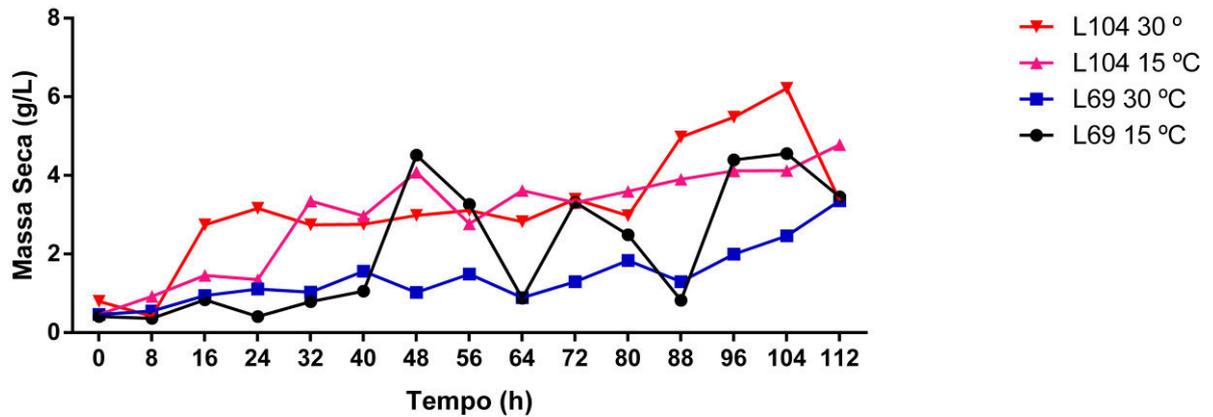


Figura 6: Massa seca (g/L), leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C

Na figura acima está representado os resultados referentes a análise de massa seca das duas leveduras L69 e L104, nas temperaturas testadas. Nota-se que houve crescimento das leveduras em ambas temperaturas, entretanto para levedura L104 o maior pico de crescimento ocorreu as 104 horas, aproximadamente 6 g/L, na temperatura de 30 °C. Já para a levedura L69 a melhor temperatura de crescimento foi 15 °C, com o maior pico, com cerca de 4,5 g/L, as 104 horas também.

### 5.4.2. Consumo de Glicose

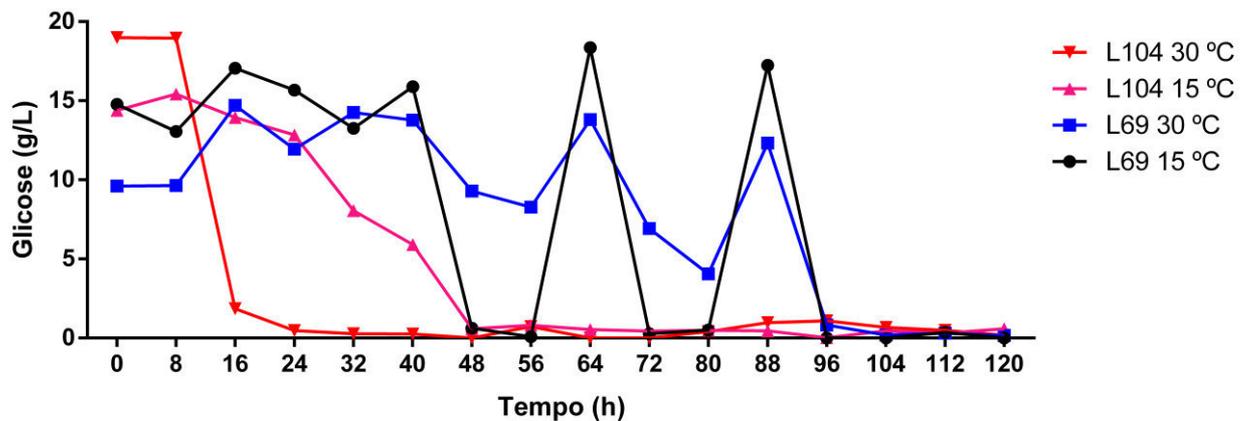


Figura 7: Glicose (g/L), leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C.

Os dados coletados durante o período experimental do consumo de glicose estão representados acima, considerando que inicialmente foi adicionado 20 g/L de glicose no meio. Na levedura L104 a 30 °C, em 16 horas a glicose foi praticamente consumida, mantendo-se em níveis próximos de zero até o fim do quinto dia. Na temperatura 15 °C, o consumo foi mais lento, decaindo vagarosamente até praticamente zero, em 48 horas, permanecendo constante nas demais horas. Em relação a L69, apesar dos experimentos serem feitos em duplicatas com o intuito de reduzir o erro experimental, os resultados apresentaram alguns erros visíveis. É de conhecimento geral que não há produção de glicose durante a fermentação por dois motivos principais, não existe presença de celulose no meio de cultivo e, acredita-se que estas leveduras não produzam celulase, enzima capaz de quebrar celulose em glicose. Portanto, os picos referentes aos tempos 64 e 88 horas, provavelmente não existem. Com isso é notável que o consumo na temperatura 15 °C, para a levedura em questão, é mais rápido que na temperatura 30 °C, pendendo a valores próximos de zero em 48 e 96 horas, respectivamente.

### 5.4.3. Índice de Emulsificação

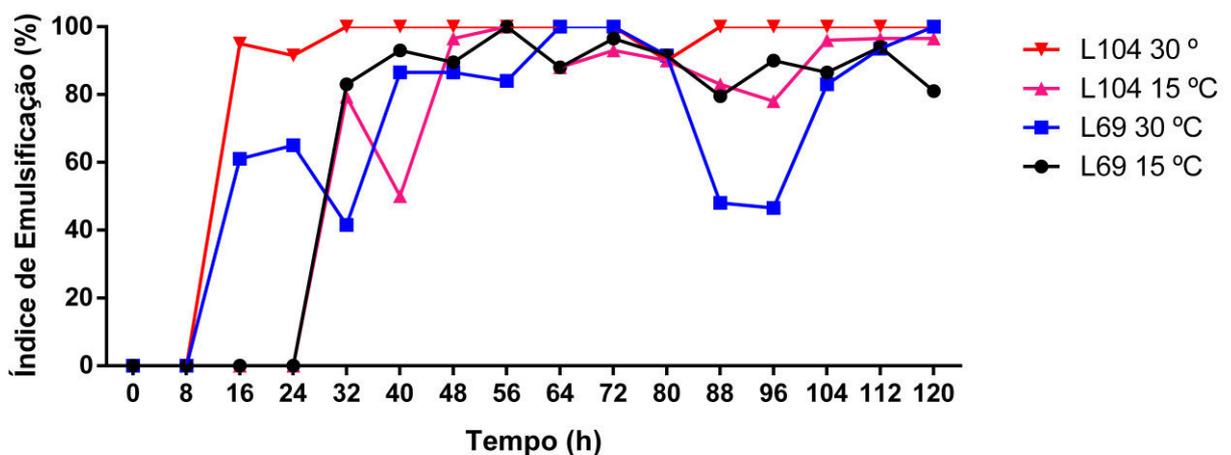


Figura 8: Índice de emulsificação (%), leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C.

O índice de emulsificação em querosene é um teste constantemente utilizado na literatura para determinar produção ou não do biosurfactante. Com estes dados, confirma-se que as leveduras testadas apresentam biomoléculas de alto peso molecular, caracterizada pela alta capacidade de emulsão. Através da figura 8, observa-se que em todas as situações testadas, o índice de emulsificação atingiu o 100%, permanecendo constante ou não. O melhor resultado foi obtido pela levedura L104 a 30 °C, que atingiu o máximo nível de emulsificação em 32 horas, permanecendo constante em praticamente todos os demais pontos. A levedura L69, a 15

°C, levou mais tempo, 56 horas, quando comparada a L104, para chegar 100% de emulsão, e apresentou oscilações nos pontos, até o fim da fermentação.

#### 5.4.4. Tensão superficial

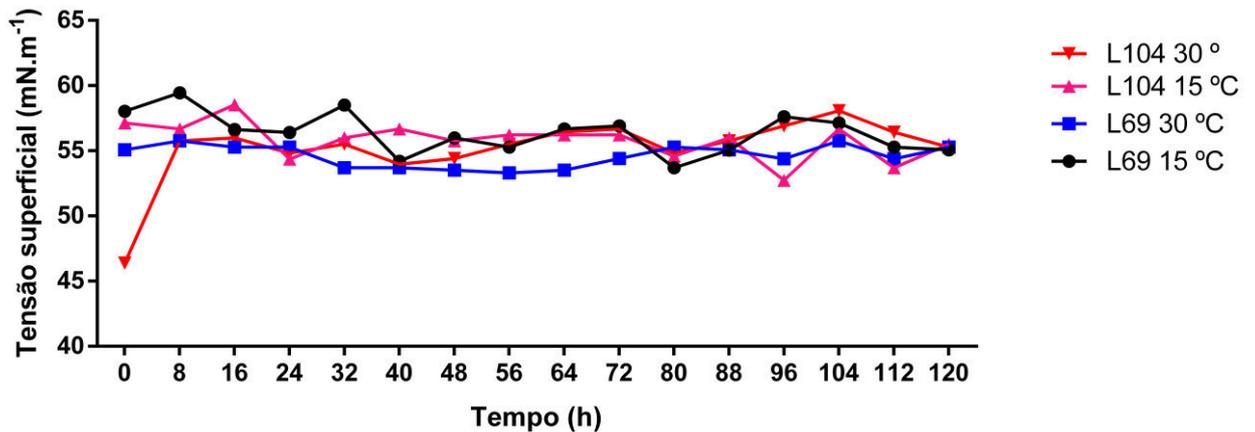


Figura 9: Tensão Superficial (mN.m<sup>-1</sup>) leveduras L69 e L104, 15 e 30 °C.

O segundo teste realizado para confirmar a produção de biossurfactante foi o de tensão superficial, que consiste na utilização de um tensiômetro para determinar a variação da tensão com a produção da biomolécula. Uma calibração deve ser realizada utilizando álcool, para correção de possíveis erros de desvio da idealidade e, principalmente, por alteração da temperatura do ambiente. Com as informações obtidas experimentalmente provou-se uma tendência a estabilidade da tensão logo nas primeiras horas, o que permite afirmar que o biossurfactante produzido não interfere na tensão superficial dos líquidos. Apesar de ser um teste necessário para determinar a veracidade da produção ou não da biomolécula é possível que elas não apresentem esta propriedade, mas apresente as demais, como a capacidade de formar emulsão (YOUSSEF, et al., 2004). Como dito anteriormente, provavelmente são surfactantes microbianos de alto peso molecular, não apresentando de forma evidente atividade de redução de tensão.

Segundo teóricos, os surfactantes produzidos por bactérias são mais eficazes na redução da tensão superficial. As *Pseudomonas aeruginosa* são as mais estudadas para produção, apresentando redução da tensão para valores baixos, de aproximadamente 27 a 28 mN.m<sup>-1</sup> (LANG e WULLBRANDT, 1999; SANTA ANNA, et al., 2001; GAUTAM e TYAGI, 2006). Estudos com a bactéria termófila *Alcaligenes faecalis* mostrou que a redução da tensão superficial iniciou rapidamente dentro de 96 horas de incubação, passando de aproximadamente 71,6 para 32 mN.m<sup>-1</sup> (BHARALI, et al., 2011). Os dados justificam, parcialmente, a

incapacidade de redução da tensão pelos biotensoativos das leveduras estudadas, porém resultados contraditórios foram encontrados por Rufino et al. (2014), em que o biossurfactante da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988, alvo de estudo deles, reduziu a tensão de 50 para 25 mN.m<sup>-1</sup>, nas primeiras horas de fermentação, cerca de 16 horas, mantendo-se em níveis constantes até o fim do período estudado.

#### 5.4.5. Cinética de crescimento microbiano e produção do biossurfactante

Após as análises dos testes realizados durante a fermentação, foi possível determinar a temperatura ótima para as duas leveduras estudadas, sendo 15 °C para L69 e 30 °C para a L104. Abaixo, representados nas figuras 10 e 11, a cinética de crescimento e a produção do biossurfactante, para os microrganismos selecionados, nas suas respectivas temperaturas ótimas. Para análise da produção do biossurfactante foi utilizado o índice de emulsificação, visto que os dados para o teste de tensão superficial, não alteraram com o passar do tempo.

Os dados para a L69 foram ajustados nos pontos 64 e 88 horas, pois apresentaram resultados improváveis, sendo atribuídos a erros experimentais. Portanto a figura 10, apresenta correções no consumo de glicose para melhor visualização da cinética microbiana.

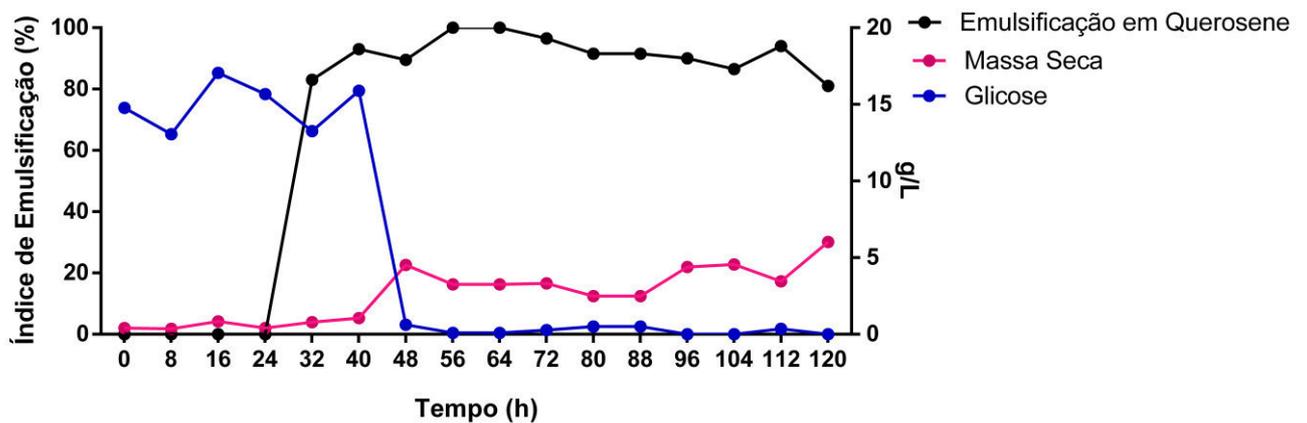


Figura 10: Cinética de crescimento da L69 e produção da biomolécula, a 15 °C.

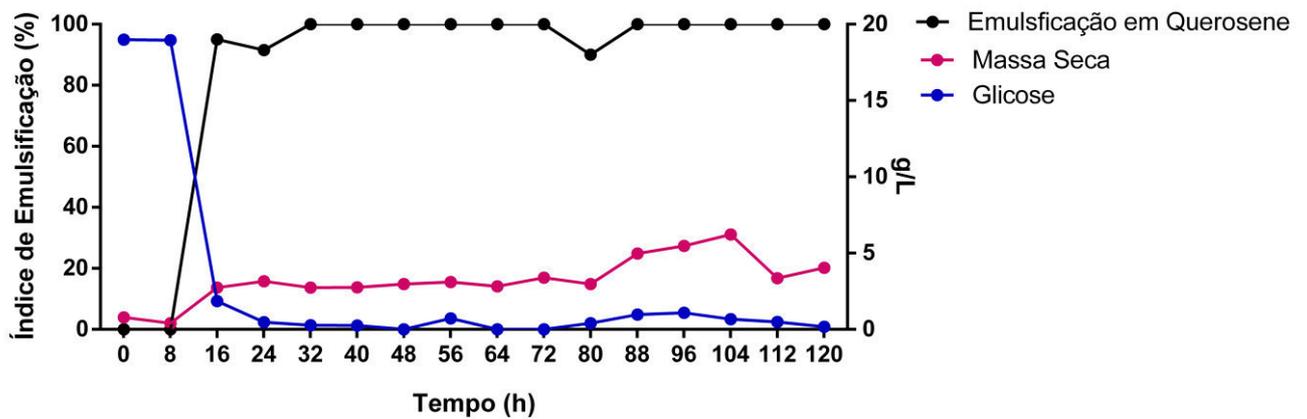


Figura 11: Cinética de crescimento da L104 e produção da biomolécula, a 30 °C.

Os dados representados nas figuras 10 e 11 demonstram que em ambas leveduras a produção do biossurfactante ocorre durante a fase exponencial e estacionária, atingindo o nível de 100% de emulsificação e mantendo-se constante durante toda as demais fases de crescimento. A glicose é praticamente toda consumida durante a fase exponencial, permanecendo com valores próximos de zero até o fim do tempo estudado (120 horas). Para a L69, a fase exponencial acaba entre 48 e 56 horas, apresentando consumo quase completo de glicose e índice de emulsificação máximo neste intervalo de tempo também. Em comparação, para a L104, a fase exponencial dura um tempo bem menor, entre 16 e 24 horas, apresentando índice de emulsificação máximo e praticamente total consumo da glicose nesta mesma duração.

Rufino e colaboradores (2014), estudando a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988, pela análise da tensão superficial, determinou que a maior produção do biotensioativo ocorreu durante a fase exponencial e estacionária do crescimento da levedura, sendo que a fase exponencial durou aproximadamente 50 horas. Singh e Tripathi (2013), que estudaram a produção de um rhamnolipídio pela bactéria *Pseudomonas stutzeri*, determinaram que a máxima produção de biossurfactante foi observada depois de sete dias, quando a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento. O biossurfactante produzido pela bactéria *Alcaligenes faecalis*, também apresentou o máximo de produção no fim da fase de crescimento exponencial (BHARALI, et al., 2011). Dados semelhantes aos encontrados nesse trabalho, em que a produção do biossurfactante se concentrou principalmente na fase exponencial e estacionária.

## 5.5. Caracterização do biossurfactante produzido

### 5.5.1. Teste de estabilidade

#### 5.5.1.1. Levedura L69

Tabela 6: Teste de estabilidade, levedura L69 a 25°C.

Levedura L69					
Temperatura (° C)	Índice de Emulsificação em Querosene (%)	Salinidade [NaCl] (g/L)	Índice de Emsulficiação em Querosene (%)	pH	Índice de Emsulficiação em Querosene (%)
20	76,25	5	77,0	4	62,50
40	83,00	15	81,0	6	71,25
60	54,50	20	77,0	8	67,50
80	80,25	50	59,0	10	68,50
100	68,00	100	70,0	12	62,00

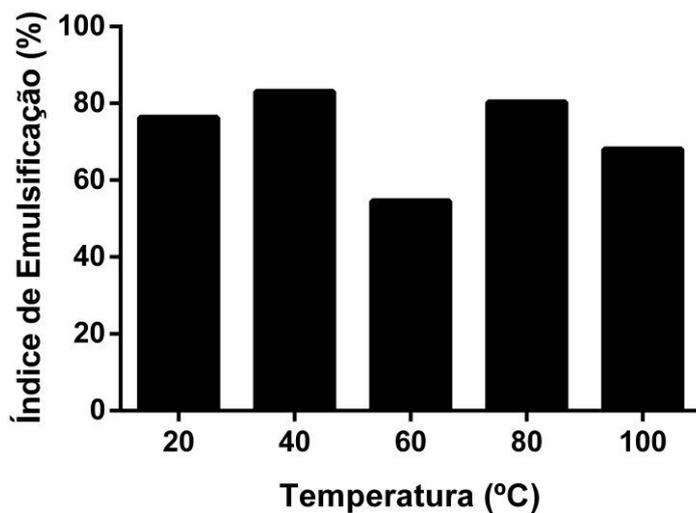


Figura 12: Teste de Estabilidade frente a variações de temperatura, da levedura L69.

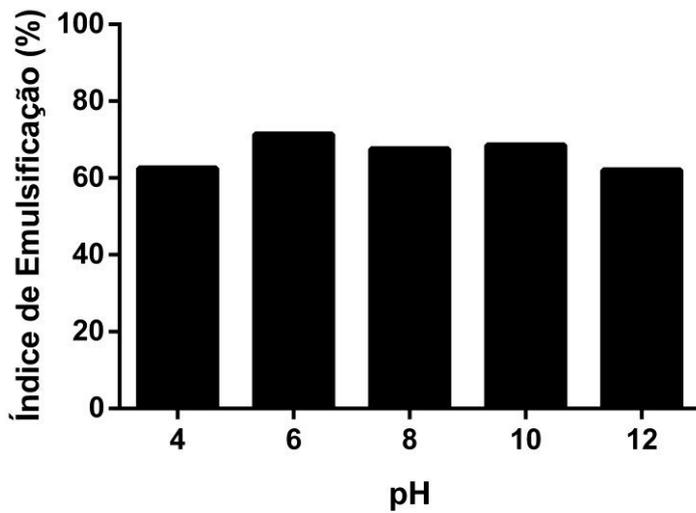


Figura 13: Teste de Estabilidade frente a variações de pH, da levedura L69.

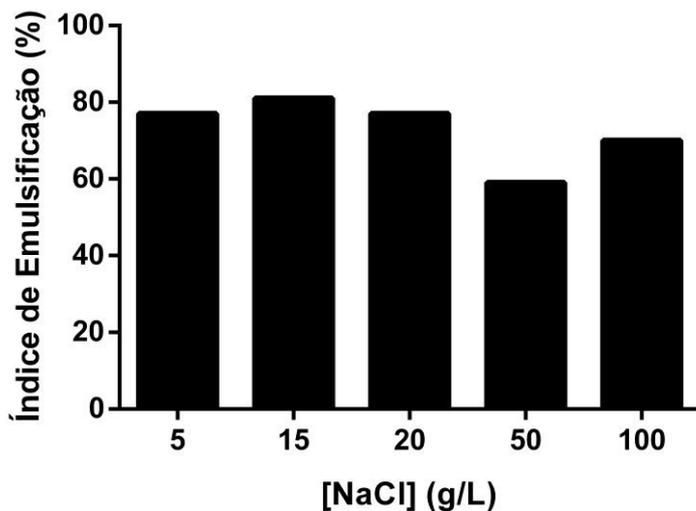


Figura 14: Teste de Estabilidade frente a variações de salinidade [NaCl], da levedura L69.

Em relação aos dados do teste de estabilidade da L69, percebe-se uma elevada estabilidade do biossurfactante produzido por esta levedura, apresentando índice de emulsificação acima de 60% em praticamente todas as condições submetidas. Em relação a temperatura, ocorreu um decréscimo da atividade na temperatura 60 °C, com 54% e 100 °C, com 68%, porém nas demais permaneceu quase inalterado, com valores entre 76 e 83%. No pH os melhores valores giraram em torno de 6 a 10, mantendo-se quase constantes nesse intervalo, variando de 68 a 71%. Nos extremos ácido e básico, a estabilidade decaiu para 62% em ambos. No teste de estabilidade para variações salinas até 20 g/L os valores ficaram menos oscilatórios, demonstrando uma estabilidade do surfactante. Com 50 e 100 g/L, a atividade reduziu

consideravelmente, 59 e 70%, respectivamente, sendo considerado que o surfactante não é estável em concentrações de 50 g/L ou mais de cloreto de sódio.

Esses dados indicam que valores mais neutros até razoavelmente básicos de pH, temperaturas abaixo de 60 °C e concentrações de sais inferiores a 50 g/L, são preferíveis para operar com esta biomolécula, pois apresenta estabilidade nestas faixas de condições. Os resultados do teste de estabilidade indicam possíveis empregabilidades na área de drenagem ácida de minas, recuperação aprimorada microbiana de petróleo, utilização em ambientes marinhos ou onde apresentam altas concentrações de sais, entre outros (CHANDRAN e DAS, 2010).

Valores semelhantes foram obtido por Singh e Tripathi (2013), estudando a estabilidade frente temperatura, pH e salinidade de um rhamnolipídio produzido pela bactéria *Pseudomonas stutzeri*. Para o meio não suplementado com carvão, o surfactante mostrou 100% de emulsão para a gama de temperatura testada (10 – 100 °C), pH de 4 – 8 e até 25% de NaCl. Para o meio suplementado com carvão, o biotensioativo apresentou estabilidade até 100 °C, na faixa de pH de 4 – 10 e 35% de NaCl. Resultados parecidos também foram obtidos por Silva et al (2014), onde o teste de estabilidade para o biosurfactante produzido pela bactéria *P. cepacia*, apresentou estabilidade na faixa de pH de 6 a 10, temperatura 70 – 120 °C e concentrações de NaCl abaixo de 10%.

#### 5.5.1.2. Levedura L104

Tabela 7: Teste de estabilidade, levedura L104 a 25°C.

Levedura L104					
Temperatura (° C)	Índice de Emulsificação em Querosene (%)	Salinidade [NaCl] (g/L)	Índice de Emulsificação em Querosene (%)	pH	Índice de Emulsificação em Querosene (%)
20	45,75	5	48,5	4	35,50
40	58,75	15	28,5	6	35,75
60	24,25	20	43,0	8	35,75
80	65,50	50	50,0	10	27,00
100	48,50	100	64,0	12	17,00

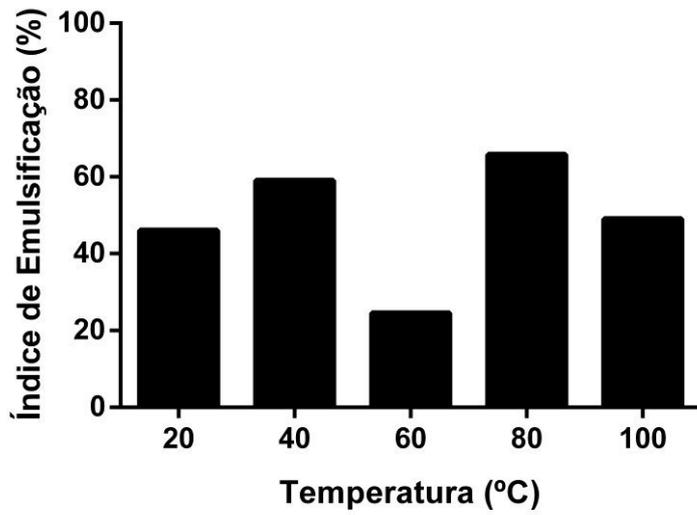


Figura 15: Teste de Estabilidade frente a variações de temperatura, da levedura L104.

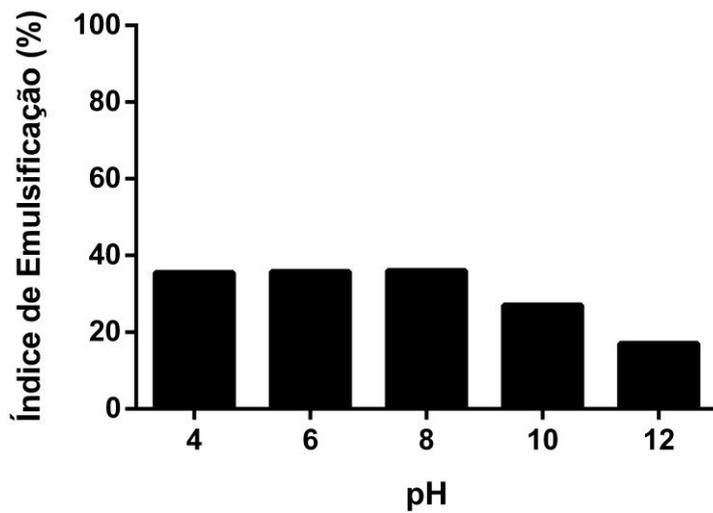


Figura 16: Teste de Estabilidade frente a variações de pH, da levedura L104.

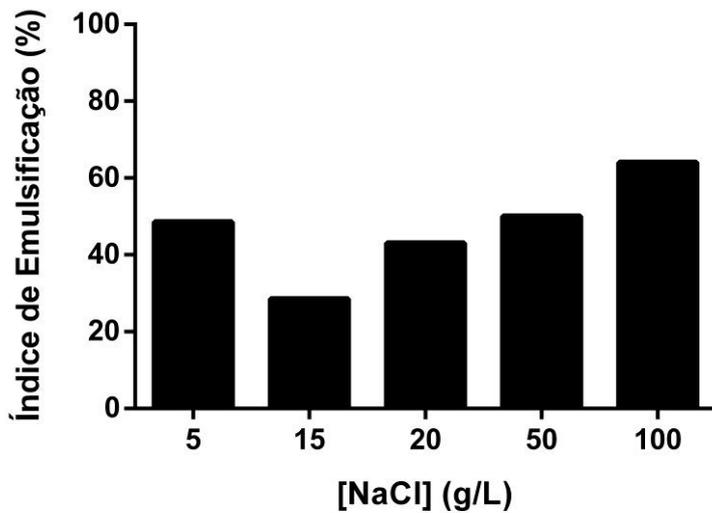


Figura 17: Teste de Estabilidade frente a variações de salinidade [NaCl], da levedura L104.

Os resultados de teste de estabilidade da L104, mostrou que apesar do biossurfactante apresentar alta atividade de emulsão, demonstrado nos resultados da curva de crescimento figuras 8 e 11, a biomolécula não apresenta estabilidade em quase todas as condições testadas, apresentando valores abaixo de 60%.

### 5.5.2. Análise de rendimento

Para o experimento de cálculo de rendimento foi definido, a partir da curva de crescimento, o melhor tempo e temperatura de fermentação para as duas levedura estudada. Com isso, para L69 foi 15 °C por 56 hr e para L104, 30 °C por 48hr.

Tabela 8: Resultados da análise de rendimento, das leveduras L69 e L104, em suas respectivas temperaturas ótimas, 15 e 30 °C.

Leveduras	L69	L104
Temperatura (°C)	15	30
Rendimento (g/L)	0,399	0,0784

Os resultados dos rendimentos indicam que a levedura L69 produz mais biossurfactante que a L104, apesar de ter ficado fermentado apenas 8hr a mais, a diferença foi significativa, aproximadamente 0,4 g/L pela L69 e 0,08g/L pela L104. Em comparação com outros

rendimentos, a produção pelas leveduras estudadas foi baixa. Para um estudo realizado por Silva et al (2014), com a bactéria *P. cepacia*, eles obtiveram máxima produção na fase estacionária, sendo de 5,2 g/L, após 144 horas de cultivo.

### 5.5.3. Concentração micelar crítica

As figuras 18 e 19 retratam os dados obtidos experimentalmente referentes à concentração micelar crítica da L69 e L104, respectivamente. A CMC é determinada quando a tensão superficial se torna constante, após decrescer com o aumento da concentração.

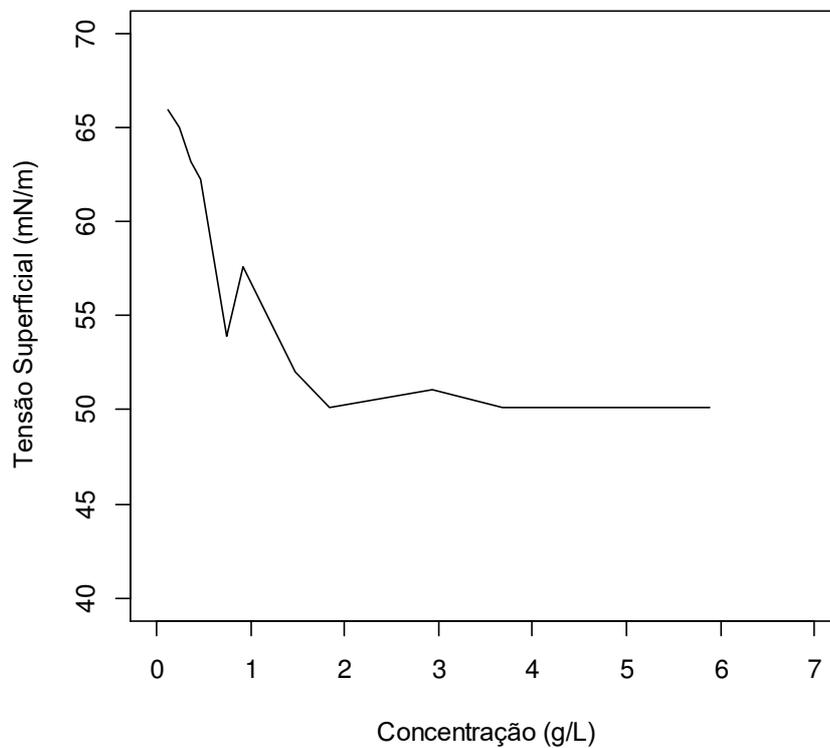


Figura 18: Concentração micelar crítica da levedura L69.

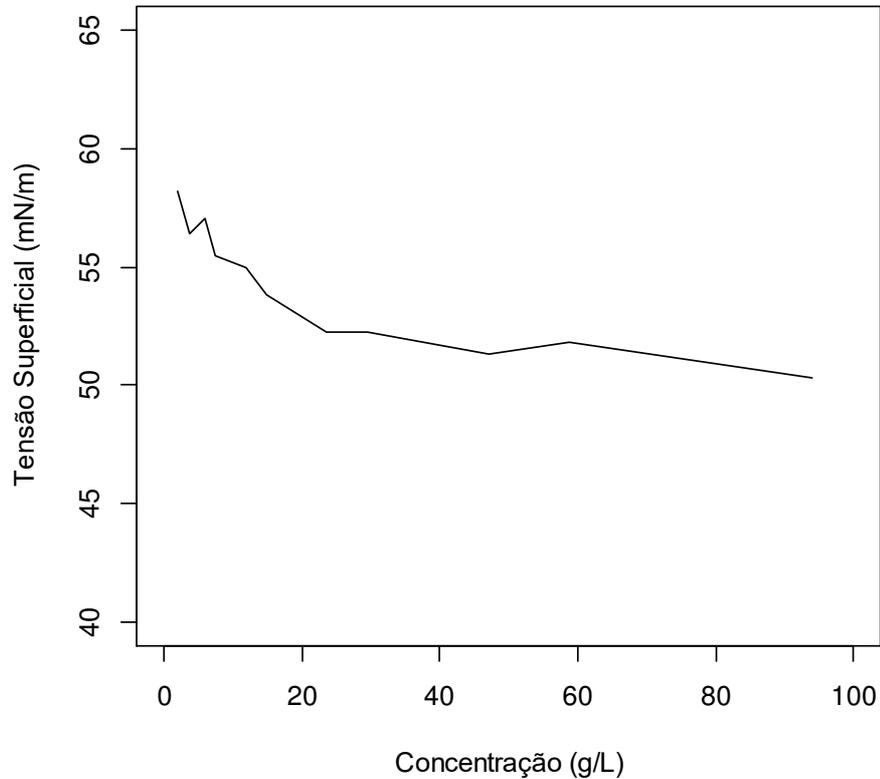


Figura 19: Concentração micelar crítica da levedura L104.

Com a análise das figuras, pode-se determinar que a estabilidade da tensão para L69 ocorreu na concentração de 2 g/L, com aproximadamente  $51 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  e, para a L104 a 20 g/L, com cerca de  $53 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , portanto a CMC das leveduras, nesta ordem, é 2 e 20 g/L. Esta enorme discrepância entre os valores da CMC, indicam que é necessita uma quantidade menor de biossurfactante produzido pela L69 para reduzir ao máximo a tensão, quando comparado ao produzido pela L104. Então, o surfactante biológico da L69 apresenta uma melhor eficiência quando equiparado ao da L104.

Silva e demais autores (2014), estudando a produção de biossurfactante pela bactéria *P. cepacia*, determinou a CMC da mesma sendo  $0,156 \text{ mg/ml}$  uma das mais baixas descritas na literatura, sendo a tensão superficial mínima atingida de  $29,77 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Khopade, et al (2012) caracterizando o biossurfactante produzido pela *Streptomyces* - B3, determinou que seu valor de CMC foi de  $110 \text{ mg/L}$ , reduzindo a tensão ao máximo para  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Apesar da L69 e

L104 não reduzirem muito a tensão superficial, a CMC delas, principalmente da L69, foi próxima a obtidas por estes pesquisadores.

#### 5.5.4. Análise de infravermelho

As figuras 20 e 21, demonstram os valores obtidos pela análise de infravermelho das leveduras L69 e L104, nesta ordem. Nas figuras, cada pico representa um grupo funcional formador da biomolécula produzida.

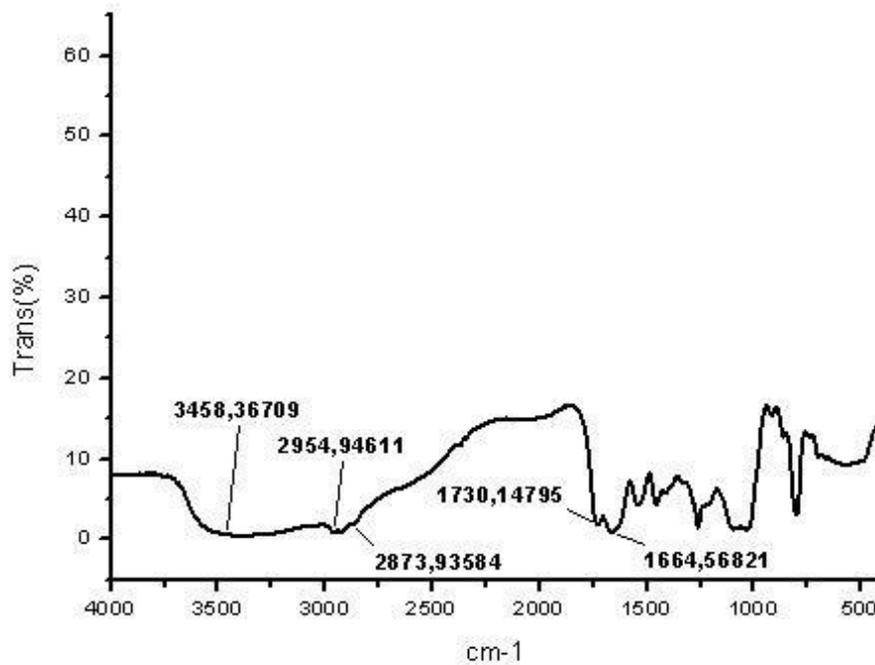


Figura 20: Resultado da análise de infravermelho do biossurfactante produzido pela levedura L69

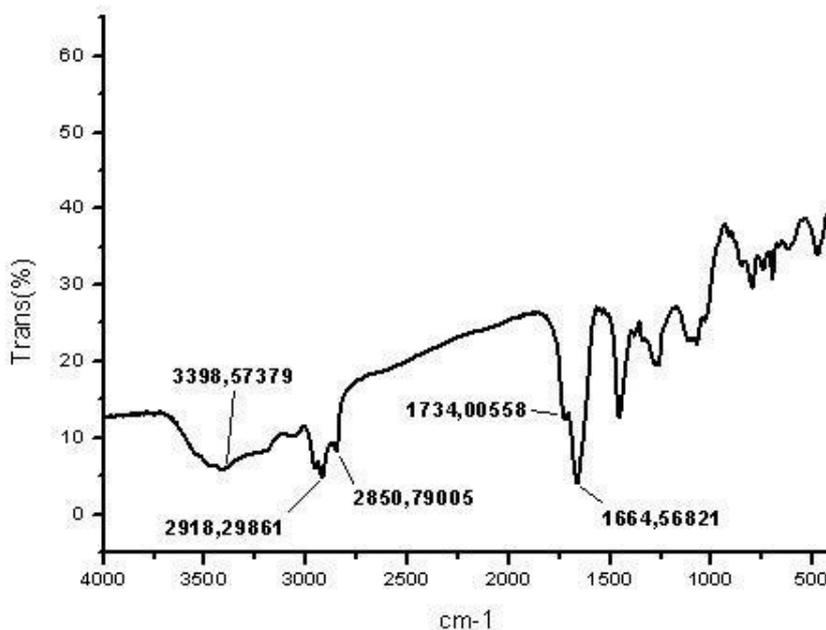


Figura 21: Resultado da análise de infravermelho do biossurfactante produzido pela levedura L104

Na figura 20 estão destacados os picos que compõem o biossurfactante produzido pela levedura L69. Grupos funcionais, tais como N-H são representados por picos entre 3500 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  podendo estar presente na molécula, visualizado pelo pico de valor aproximado 3458  $\text{cm}^{-1}$  indicando a presença de amins ou amidas, C-H apresentam dois picos bem representados, de valores com 2954 e 2873  $\text{cm}^{-1}$ , aproximadamente, visto que na literatura, sabe-se que picos entre 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$  caracterizam cadeias alifáticas (FONTES, et al., 2009). Grupos funcionais como aldeídos, ésteres, cetonas e ácidos carboxílicos, podem ser representados por vibrações entre 1750-1720  $\text{cm}^{-1}$ , evidenciando a presença de ligações do tipo C=O na biomolécula. A banda de ~1664 é atribuída a grupos -CONH, que são encontrados em vibrações entre 1650 a 1550  $\text{cm}^{-1}$  (POKORNA, 2009).

Dados semelhantes foram encontrados na análise de infravermelho do biossurfactante produzido pela L104. Os picos representam praticamente os mesmos grupamentos funcionais, discutidos acima, apresentando bandas com ~2918 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , representando cadeias alifáticas, vibrações entre 1750-1720  $\text{cm}^{-1}$ , representando grupamentos funcionais do tipo C=O, tais como aldeídos, éteres, ácidos carboxílicos e cetona. O pico de 1664  $\text{cm}^{-1}$ , exatamente o mesmo valor encontrado pelo biossurfactante da L69, representando grupos -CONH e, o primeiro pico, da esquerda para direita, representado na figura 21, com aproximadamente 3398  $\text{cm}^{-1}$ , representando álcoois, fenóis ou amins e amidas.

Tais dados demonstram que os biossurfactantes apresentam praticamente a mesma estrutura, com alterações insignificantes nos valores. Tal similaridade pode ser devido as leveduras testadas pertencerem ao mesmo gênero, *Rhodotorulas*. Resultados semelhantes foram obtidos por Singh e Tripathi estudarem o biossurfactante produzido por *Pseudomonas stutzeri*. A análise de infravermelho realizada por eles demonstrou a presença de grupamentos O-H, CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>, COOH e C-O, com valores das bandas de aproximadamente 3416, 2924 – 2853, 1467 e 1024 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Este último sendo característico em ligações entre átomos de carbonos e grupos hidroxil na estrutura química do anel de ramanose. Os picos, 3500-2700, 1720-1680 e 950-900 cm<sup>-1</sup>, indicam a presença de compostos com características de um ramnolipideo.

## 6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos e informações da literatura, comprovou-se a capacidade de produção do biossurfactante pelas leveduras do gênero *Rhodotorulas* isoladas da Antártica, foco do atual estudo. Sendo que a *Rhodotorula mucilaginosa*, codificada por L69, apresentou os melhores resultados podendo ser de grande interesse industrial sua produção em larga escala, devido ao seu maior rendimento, melhor capacidade de emulsificação e ampla faixa de tolerância a condições extremas, além de sua temperatura ótima ser mais amena, exigindo menor controle das condições de cultivo.

Para estudos futuros a melhor caracterização do biossurfactante produzido pela L69 se faz necessária para aumentar o conhecimento, auxiliando na determinação de qual setor industrial ele será mais atrativo. Experimentos relacionados a otimização da produção e utilização de substratos renováveis tornou-se alvo de estudo de vários pesquisadores e, também, uma alternativa para continuidade desse trabalho.

## Referência

- ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial Steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology Biotechnology**, [s.l.], v. 46, p.67-73, 1996.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic, p. 453, 1999.
- AMARAL P. F.; COELHO M. A.; MARRUCHO I. M. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Adv Exp Med**, [s.l.], v. 672, p. 236-49, 2010.
- ANDRADE, R. F. S.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. **1º Workshop Meio Ambiente, Ciência e tecnologia de mãos dadas para o futuro**, Pernambuco, Brasil, 2006.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR R. S.; CAMEOTRA S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARBIERI, E.; SCHIAVANO, G. F.; SANTI, M.; VALLORANI, L.; CASADEI, L.; GUESCINI, M.; GIOACCHINI, A. M.; RINALDI, L.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 23, p. 62-67, 2012.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, p. 409, 2007.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C.. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS microbiology reviews**, [s.l.], v. 19, p. 219-237, 1997.
- BEAL, R.; BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the up take and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Appl. Microbiol.**, [s.l.], v. 89, p. 158-168, 2000.
- BHADURY, P.; MOHAMMAD, B.T.; WRIGHT, P.C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 33, p. 325-337, 2006.
- BHAIRI, S. M. Detergents – **A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems**. Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla, 2001.
- BHARALI, P.; DAS, S.; KONWAR, B. K.; THAKUR, A. J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 65, p. 682-690, 2011.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 32, p. 273-280, 1998.

- BOGNOLO G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 152, p. 41-52, 1999.
- BRANCO, L. S. C. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenóides**. CBOQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BRINCK, J.; JÖNSSON, B.; TIBERG, F. Kinetics of non-ionic surfactant adsorption and desorption at the silica – water interface: one component. **Langmuir**, [s.l.], v. 14, p. 1058-1071, 1998.
- BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine genomics**, [s.l.], v. 2, p. 43-50, 2009.
- BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiol. Lett.**, [s.l.], v. 244, p. 229-234, 2005.
- BUZZINI P. et al. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 82, p. 217-241, 2012.
- CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T.. Screening of biosurfactante producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, [s.l.], v. 86, p. 402-410, 2014.
- CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Adv Exp Med Biol**, [s.l.], v. 672, p. 261–280, 2010.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current opinion in microbiology**, [s.l.], v. 7, p. 262-266, 2004.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 50, p. 520-529, 1998.
- CHANDRAN, P.; DAS, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soils. **Int. J. Eng. Sci. Technol.**, [s.l.], v. 2, p. 6942–6953, 2010.
- CONNELL L.; REDMAN, R.; CRAIG, S.; SCORZETTI, G.; ISZARD, M.; RODRIGUEZ, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 56, p. 448–459, 2008.
- COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental microbiology**, [s.l.], v. 42, p. 408-412, 1981.
- COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and environmental microbiology**, [s.l.], v. 47, p. 173-176, 1984.
- COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered antarctic environments. **Annu. Rev. Microbiol.**, [s.l.], v. 58, p. 649-690, 2004.

- DA ROCHA, S. R. P.; HARRISON, K. L.; JOHNSTON, K. P. Effect of surfactants on the interfacial tension and emulsion formation between water and carbon dioxide. **Langmuir**, [s.l.], v. 15, p. 419-428, 1999.
- D'AMICO S.; COLLINS, T.; MARX, J. C.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **EMBO reports**, [s.l.], v. 7, p. 385-389, 2006.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of applied microbiology**, [s.l.], v. 104, p. 1675-1684, 2008.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresour Technol. Barking**, [s.l.], v. 100, p. 1015-1019, 2009.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIQUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potentials. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. [s.l.], v. 61, p. 47-64, 1997.
- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.), **Biosurfactants: Production, Properties, Applications**, [s.l.], v. 48, p. 65-91, 1993.
- DU NOÛY, P.L. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. **The Journal of General Physiology**, [s.l.], v. 7, p. 625-633, 1925.
- DUARTE, A. W. F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F. S.; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L. C.S.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G. A.; SETTE, L. D. Taxonomic assesment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antartic samples. **Extremophiles**, [s.l.], v. 17, p. 1023-1035, 2013.
- DUBEY, K.V.; CHARDE, P. N.; MESHARAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**. [s.l.], v. 126, p. 368-374, 2012.
- FELL, J. W.; STATZELL-TALMAN, A. *Rhodotorula*. F. C. Harrison. In: KURTZMAN C. P., FELL, J. W. (Eds), **The yeasts, a taxonomic study**, Nova York, p. 800-827, 2000.
- FENICE, M.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. **Polar Biology**, [s.l.], v. 17, p. 275-280, 1997.
- FLASZ, A.; ROCHA, C. A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical science research**, [s.l.], v. 26, p. 181-185, 1998.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, p. 2091-2099, 2008.
- FONTES, I.; AZUARA, M.; GEA, G.; MURILLO, M. B. Study of the pyrolysis liquids obtained from different sewage sludge. **J. Anal. Appl. Pyrol.**, v. 85, p. 184-191, 2009.

- FRANCY D.S.; THOMAS, J. M.; TAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **J. Ind. Microbiol**, [s.l.], v. 8, p. 237-246, 1991.
- FRIEDMAN, Z.; ROSENBERG, A. Abnormal lung surfactant related to essential fatty acid deficiency in a neonate. **Pediatrics**, [s.l.], v. 63, p. 855-859, 1979.
- GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, [s.l.], v. 89, p. 483-496, 2002.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: A review. **Journal of Oleo Science**, [s.l.], v. 55, p. 155-166, 2006.
- GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biociência & Desenvolvimento**, [s.l.], p. 36-43, 2005.
- GERDAY C. et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 18, p. 103-107, 2000.
- GESHEVA, V.; STACKEBRANDT, E.; VASILEVA-TONKOVA, E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey station, Wilkes land, Antarctica. **Current microbiology**, [s.l.], v. 61, p. 112-117, 2010.
- GHOJAVAND H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEIB, E.; SHAHRAKI, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 324, p. 172-176, 2008.
- GILBERT, J. A.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R.; LAYBOURN-PARRY, J. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. **Microbiology**, [s.l.], v. 150, p. 171-180, 2004.
- GROB, C.; SYLDATK, C.; WAGNER, F. Screening method for microorganisms producing L-aminoacids from D, L-5-monosubstituted hydantoins. **Biotechnology Techniques**, [s.l.], v. 1, p. 85-90, 1987.
- HARPER, G. R.; DAVIES, M. C.; DAVIS, S. S.; TADROS, Th. F.; TAYLOR, D. C.; IRVING, M. P.; WATERS, J. A. Sterile stabilization of microspheres with grafted polyethylene oxide reduces phagocytosis by rat Kupffer cells in vitro. **Biomaterials**, [s.l.], v. 12, p. 695-700, 1991.
- HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Reviews on Biomembranes**, [s.l.], v. 415, p. 29-79, 1975.
- HINZE, W. L.; PRAMAURO, E. . A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extractions): theory and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 24, p. 133-177, 1993.
- HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RILKE, O.; KLEBER, H. P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of biotechnology**, [s.l.], v. 33, p. 147-155, 1994.
- HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W. Michael. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of industrial microbiology**, [s.l.], v. 6, p. 243-248, 1990.

- KÄPPELI O.; FIECHTER A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. **J. Bacteriol.**, [s.l.], v. 131, p. 917-921, 1977.
- KÄPPELI, O.; FINNERTY, W. R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of bacteriology**, [s.l.], v. 140, p. 707-712, 1979.
- KAWAHARA, H. Cryoprotectants and ice-binding proteins. In: *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, cap., 14, p. 229-246, 2008.
- KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X. Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 367, p. 311-318, 2012.
- KIM, H.; RAO, P. S. C.; ANNABLE, M. D. Determination of effective air-water interfacial area in partially saturated porous media using surfactant adsorption. **Water Resources Research**, [s.l.], v. 33, p. 2705-2711, 1997.
- KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and applied biochemistry**, [s.l.], v. 31, p. 249-253, 2000.
- KIMURA, A.; MORITA, M. Fermentative Formation of CDP-Choline by Intact Cells of a Yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* (IFO 0641) Treated with a Detergent, Triton X-100. **Agricultural and Biological Chemistry**, [s.l.], v. 39, p. 1469-1474, 1975.
- KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; SHINBO, T.; NAKANE, T.; KAMISAWA, C.; NAKAHARA, T. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 29, p. 91-96, 1993.
- KOSARIC N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 64, p. 1731-1737, 1992.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 46, p. 149-156, 2001.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENETT, J. E. Infections due to *Trichosporon* and miscellaneous fungi. In: KWON -CHUNG, K. J.; BENETT, J. E., (Eds.), **Medical mycology**, Philadelphia: Lea & Febiger, p. 768-782, 1992.
- LANG, S.; WULBRANDT, D. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 51, p. 22-32, 1999.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.
- LIN, S.C. Biosurfactants: Recent advances. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, [s.l.], v. 66, p. 109–120, 1996.
- MAIER, R.M. Biosurfactantes: evolution and diversity in bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.**, [s.l.], v. 52, p. 101-121, 2003.

- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 20, p. 48-52, 1998.
- MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable resources. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, [s.l.], v. 27, p. 675-683, 2005.
- MARGESIN, R.; FELL, J. W. *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, anamorphic, basidiomycetous yeast from alpine and arctic habitats. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, [s.l.], v. 58, p. 2977-2982, 2008.
- MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in microbiology**, [s.l.], v. 162, p. 346-361, 2011.
- MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M. J.; ANDRÉS, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 43, p. 1-6, 1993.
- MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 108f. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. **Letters in applied microbiology**, [s.l.], v. 48, p. 281-288, 2009.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.), **Biosurfactants: Production, Properties, Applications**, [s.l.], v. 48, p. 329-371, 1993.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, [s.l.], v. 60, p. 371-380, 2001.
- NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z. ; MANIASSO, N. Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, p. 483-489, 2002.
- NITSCHKE M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 18, p. 252-259, 2007.
- NITSCHKE M.; PASTORRE G. M. Biosurfactants: Properties and applications. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 25, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s.l.], v. 106, p. 295-301, 2003.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M.. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, [s.l.], v. 47, p. 209-214, 1995.

- OLOKE, J. K.; GLICK, B. R. Production of bioemulsifier by an unusual isolate of salmon/red melanin containing *Rhodotorula glutinis*. **Afr. J. Biotechnol.**, [s.l.], v. 4, p. 164-171, 2005.
- ONOFRI, S. et al. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, [s.l.], v. 40, p. 1657-1664, 2007.
- PACWA-PŁOCINICZAK M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **Int J Mol Sci**, [s.l.], v. 12, p. 633–654, 2011.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PAVLOVA K.; RUSINOVA-VIDEVA, S.; KUNCHEVA, M.; KRATCHANOVA, M.; GOCHEVA, M.; DIMITROVA, S. Synthesis and Characterization of an Exopolysaccharide by Antarctic Yeast Strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 163, p. 1038-1052, 2011.
- PAVLOVA, K.; GRIGOROVA, D.; HRISTOZOVA, T.; ANGELOV, A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. **Folia Microbiol. (Praha)**, [s.l.], v.45, p. 397-401, 2001.
- PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E. Analytical applications of organized molecular assemblies. **Analytical Chimica Acta**, [s.l.], v. 169, p. 1-29, 1985.
- POKORNA, E.; POSTELMANS, N.; JENICEK, P.; SCHREUS, S.; CARLEER, R.; YPERMAN, J. Study of bio-oils and solids from flash pyrolysis of sewage sludges. **Fuel**, [s.l.], v. 88, p. 1344-1355, 2009.
- PORTER, M. R. Handbook of surfactants. Nova York: Chapman & Hall, 2<sup>a</sup> ed., 1994.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology progress**, [s.l.], v. 18, p. 1277-1281, 2002.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New phytologist**, [s.l.], v. 151, p. 341-353, 2001.
- ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 8, p. 125-128, 1992.
- ROSA, M. M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 26, p. 1491-1502, 2010.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. **Current opinion in biotechnology**, [s.l.], v. 8, p. 313-316, 1997.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low- molecular-mass microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 52, p. 154-162, 1999.

- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 17, p. 34-38, 2014.
- RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [s.l.], v. 6, p. 127-141, 2007.
- SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA Jr., N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, [s.l.], v. 91, 459-467, 2001.
- SARKAR A. K.; SHARMA, M. M.; GOURSAUD, J. C.; GEORGIU, G. A critical evaluation of MEOR processes. **In Situ**, [s.l.], v. 13, p. 207-238, 1989.
- SHELL, W. A. New aspects of emerging fungal pathogens. A multifaceted challenge. **Clinics in laboratory medicine**, [s.l.], v. 15, p. 365-387, 1995.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, j.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 40, p. 207-217, 1995.
- SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? **Archives of microbiology**, [s.l.], v. 192, p. 85-95, 2010.
- SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 3, p. 132-139, 2014.
- SILVA, N. R. A. S.; LUNA, M. A.; SANTIAGO, A. L.; FRANCO, L. O.; SILVA, G. K.; DE SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C. D.; DA SILVA, C. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulate* isolated from coating soil in the Northeast of Brazil. **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l.], v. 15, p. 15377-15395, 2014.
- SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 79, p. 174-183, 2010.
- SINGH, D. N.; TRIPATHI, A. K. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 128, p. 215-221, 2013.
- SINGH, N. S.; SHAO, N.; MCLEAN, J. R.; SEVUGAN, M.; REN, L.; CHEW, T. G.; BIMBO, A.; SHARMA, R.; TANG, X.; GOULD, K. L.; BALASUBRAMANIAN, M. K. SIN-inhibitory phosphatase complex promotes Cdc11p dephosphorylation and propagates SIN asymmetry in fission yeast. **Current Biology**, [s.l.], v. 21, p. 1968-1978, 2011.
- STELLER S.; VATER J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, [s.l.], v. 737, p. 267-275, 2000.

- THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in applied microbiology**, [s.l.], v. 45, p. 686-691, 2007.
- THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press**, [s.l.], v. 84-86, p. 917-930, 2000.
- WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical water waste. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 27, p. 146-154, 2005.
- YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. **Environmental microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 2223-2235, 2008.
- YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCLNERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 56, p. 347-399, 2004.