



**Produção, extração e caracterização parcial  
do biossurfactante produzido por *Yarrowia  
lipolytica* a partir de fontes renováveis**

Naíra Menezes Ramos

Projeto Final de Curso

Orientadores:

Prof<sup>ª</sup> Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

Prof<sup>ª</sup> D. Sc. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Gizele Cardoso Sant'Ana Fontes, D. Sc.

Mariana Miguez Tardelli Garcia, M. Sc.

Novembro de 2013

**Produção, extração e caracterização parcial do  
biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica* a partir de  
fontes renováveis**

***Náira Menezes Ramos***

Projeto de Final de Curso submetido ao corpo docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Graduação de Engenharia Química.

Aprovado por:

---

Prof<sup>o</sup> Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc.

---

Kelly Alencar Silva, D. Sc.

---

Fernanda de Lima Martins, D. Sc.

Orientado por:

---

Prof<sup>a</sup>. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

---

Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, D. Sc.

---

Mariana Miguez Tardelli Garcia, M. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Novembro de 2013

Ramos, Naíra Menezes.

Produção, extração e caracterização parcial do biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica* a partir fontes renováveis. Naíra Menezes Ramos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013.

xiii, 73p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2013.

Orientadores: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Maria Alice Zarur Coelho, Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana e Mariana Miguez Tardelli Garcia.

1. Biossurfactante. 2. Emulsão. 3. Valorização de resíduos. 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Maria Alice Zarur Coelho, Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana e Mariana Miguez Tardelli Garcia. I. Título

“A força não provém de uma capacidade física.

Provém de uma vontade indomável.”

*Mahatma Ghandi*

Dedico este trabalho  
à minha querida mãe,  
Angela

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha mãe, que sempre me apoiou muito durante a faculdade e que me ajudou inclusive a revisar este trabalho várias vezes com muito carinho.

Ao meu pai, que desde o início me incentivou a estudar e me deu forças para chegar até o fim do curso em todas as vezes que eu pensei em desistir. E que não deixou de estar presente em nenhum momento importante, mesmo morando longe.

A todos do laboratório BIOSE, com quem aprendi muito e com certeza me ajudaram a crescer na minha jornada acadêmica. Mais do que isso, no BIOSE encontrei uma família onde sei que sempre serei bem recebida, mesmo que não esteja mais participando de nenhum projeto dentro do laboratório.

Em especial, gostaria de agradecer à minha primeira orientadora, a Gi, que pacientemente me ensinou as práticas básicas de um laboratório de bioquímica, como inocular e preparar um meio de cultivo YPD, e que me ajudou imensamente na elaboração deste trabalho.

Agradeço à professora Maria Alice, por ter me dado a oportunidade de participar de um grupo tão unido e de nível profissional tão elevado.

À professora Priscilla, por ter me apresentado a *Yarrowia* e por sido minha orientadora todos esses anos.

À minha segunda orientadora, Mari, que me ensinou toda a técnica para a análise de imagem e com quem ainda aprendi muita coisa no laboratório.

À Kelly, que me ensinou a tirar as fotografias das emulsões e me ensinou a utilizar o microscópio óptico e à Rose, pela ajuda com a eletroforese.

Ao professor Bernardo, que por mesmo não sendo meu orientador diretamente, diversas vezes já me deu auxílio e opiniões importantes sobre os meus resultados.

Agradeço também às minhas amigas mais próximas, Dayana, Carol, Marja e Formiga, pela companhia e por sempre estivarem presentes quando eu precisava.

A todos os meus outros amigos do Guanabara e da faculdade, que tornaram a experiência acadêmica mais familiar e meus finais de semana mais agradáveis.

Agradeço, por fim, à Faperj e ao Pibic, pelos 12 meses de bolsa de iniciação científica cada um.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Graduação em Engenharia Química

## **PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *YARROWIA LIPOLYTICA* A PARTIR DE FONTES RENOVÁVEIS**

Naíra Menezes Ramos

Novembro, 2013

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Prof<sup>a</sup> Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, D.Sc.

Mariana Miguez Tardelli Garcia, D.Sc.

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas por micro-organismos. Embora apresentem diversas aplicações, o seu uso é limitado pelo alto custo de produção. Com o intuito de viabilizar o seu uso, neste trabalho foram escolhidas matérias-primas renováveis e de baixo valor agregado: o glicerol, subproduto da produção de biodiesel; e o rejeito agroindustrial do suco de caju. A extração e caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos por *Yarrowia lipolytica* também são objetivos deste trabalho. Os experimentos foram conduzidos em incubador rotatório a 28°C e 250 rpm por 96 horas. Para a recuperação dos biossurfactantes, diferentes sistemas de solventes foram avaliados. O biossurfactante parcialmente purificado foi em seguida caracterizado quanto à quantidade de proteína e à concentração micelar crítica. Posteriormente, foram avaliados a estabilidade e o mecanismo de envelhecimento de emulsões óleo-em-água preparadas com os biossurfactantes produzidos e com Goma Arábica. As emulsões foram preparadas em um Ultra-Turrax (12000 rpm) por 3 minutos e a distribuição de tamanho de micela foi acompanhada por meio de análise digital de imagem utilizando um microscópio eletrônico. Resultados satisfatórios de índice de emulsificação (IE) e de variação da tensão superficial ( $\Delta TS$ ) foram obtidos para ambos os biossurfactantes produzidos. A maior produção de biossurfactante foi obtida com extrato concentrado e o sistema de solventes clorofórmio/metanol, na proporção de 1:8:8, sendo esta de 7,92 g.L<sup>-1</sup> para o biossurfactante produzido com glicerina bruta e de 6,85 g.L<sup>-1</sup> para o produzido a partir de suco de caju clarificado. A concentração micelar crítica do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta foi 1,77 g.L<sup>-1</sup> e a concentração de proteínas foi 13,45%, enquanto para o biossurfactante produzido a partir do suco de caju clarificado, estas foram 7,85 g.L<sup>-1</sup> e 9,35%. Os resultados da análise digital de imagem

indicaram que as emulsões preparadas com o biossurfactante produzido a partir de glicerina bruta e com Goma Arábica se mantiveram estáveis.

# ÍNDICE

Introdução.....	1
Objetivos.....	3
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica .....	4
1.1    Surfactantes .....	4
1.2    Biossurfactantes.....	7
1.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	13
1.4    Fontes de Carbono de Origem Renovável.....	15
1.4.1.    Glicerina Bruta como Fonte de Carbono.....	15
1.4.2.    Suco de Caju como Fonte de Carbono .....	19
1.5    Tensão Superficial .....	21
1.6    Emulsões.....	23
1.7    Mecanismos de Envelhecimento .....	25
Capítulo 2: Metodologia Experimental .....	28
2.1.    Materiais e Métodos .....	28
2.2.    Condições de Micro-organismo e Inóculo.....	29
2.2.1.    Manutenção do Meio de Cultura .....	29
2.2.2.    Obtenção do Inóculo.....	29
2.3.    Produção do Biossurfactante .....	29
2.3.1.    A Partir de Glicerina Bruta.....	30
2.3.2.    A Partir de Suco de Caju Clarificado (CACJ).....	30
2.4    Extração do Biossurfactante .....	31
2.5    Determinação da Produção do Biossurfactante.....	33
2.5.1.    Tensão Superficial .....	33
2.5.2.    Índice de Emulsificação (IE).....	33
2.6.    Métodos Analíticos.....	34

2.6.1.	Quantificação do Crescimento Celular.....	34
2.6.2.	Determinação da Concentração de Glicose .....	35
2.6.3.	pH do Meio de Cultivo .....	36
2.6.4.	Determinação da Concentração de Açúcares Totais .....	36
2.6.5.	Determinação da Concentração de Glicerol .....	36
2.6.6	Métodos para a Caracterização do Biossurfactante.....	37
2.7.	Avaliação da Estabilidade das Emulsões .....	38
2.7.1.	Preparo das Emulsões .....	39
2.7.2.	Análise de Imagem .....	39
Capítulo 3:	Resultados e Discussão.....	43
3.1	Produção do Biossurfactante .....	43
3.2.	Purificação do Biossurfactante .....	47
3.2.1.	Purificação a partir do Meio de Cultivo contendo Glicerol Bruto .....	47
3.2.2.	Purificação a partir do Meio de Cultivo contendo CACJ.....	50
3.3.	Caracterização do Biossurfactante.....	51
3.3.1.	Determinação da Concentração de Proteínas .....	51
3.3.2.	Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	52
3.4.	Avaliação da Estabilidade de Emulsões .....	53
Conclusões.....		60
Sugestões para Trabalhos Futuros .....		61
Referências .....		62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do surfactante Lauril Éter Sulfato de Sódio. ....	5
Figura 2 - Estrutura química do heptassacarídeo isolado da goma arábica. ....	5
Figura 3 - Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.....	7
Figura 4 - Estruturas químicas de alguns biossurfactante .....	9
Figura 5 - Morfologia microscópica de <i>Y. lipolytica</i> .....	13
Figura 6 - Estrutura molecular do glicerol.....	15
Figura 7 - Fluxograma da produção do biodiesel .....	16
Figura 8 - Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool. ....	16
Figura 9 - Foto de um funil de separação contendo as duas fases líquidas .....	17
Figura 10 - Fruto e pseudofruto do caju .....	20
Figura 11 - Diminuição da tensão superficial da água em função da concentração de biossurfactante. ....	22
Figura 12 – Esquema de formação de uma micela esférica a partir da CMC .....	23
Figura 13 - Sistema heterogêneo de dispersão de um líquido imiscível .....	24
Figura 14. Fluxograma completo do processo de obtenção dos biossurfactantes.....	32
Figura 15 - Medição do IE dos meios de cultivo.....	34
Figura 16 - Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> através de medidas de absorbância em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800).....	35
Figura 17 - Curva padrão de DNS (glicose + frutose) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo.....	36
Figura 18 - Curva padrão glicerol.....	37
Figura 19 – Curva padrão da concentração da proteína BSA medida em espectrofotômetro. ....	38
Figura 20 - Equipamento para aquisição de imagem: Microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200, acoplado a câmera de vídeo digital, Evolution VF cooled color.....	40
Figura 21 - Tratamento das imagens obtidas por microscopia.....	41
Figura 22 - Perfil cinético de crescimento de <i>Y. lipolytica</i> (■) e de consumo do glicerol (◆) em meio contendo glicerina bruta (3%).....	43
Figura 23 - Evolução do índice de emulsificação (■) e da tensão superficial (◆) durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina. ....	44

Figura 24 - Perfil cinético de crescimento de <i>Y. lipolytica</i> (■) e consumo de açúcares totais (■) em meio contendo suco de caju diluído de 1:10.....	45
Figura 25 - Evolução do índice de emulsificação (◆) e da tensão superficial (x) durante a produção de biossurfactante em meio contendo suco de caju .....	46
Figura 26 - Produção da extração do biossurfactante utilizando como solventes: acetona (1), acetato de etila (2) e clorofórmio/metanol (3) .....	48
Figura 27 - Produção de biossurfactante a partir de diferentes proporções de extrato concentrado/clorofórmio/metanol .....	49
Figura 28 – Fotografia do processo de extração do biossurfactante. Funil de separação contendo: extrato concentrado/clorofórmio/metanol, na proporção de 1:8:8, com formação de precipitado branco no fundo. ....	49
Figura 29 - Produção de extração do biossurfactante produzido a partir do CACJ utilizando como solventes: acetato de etila, acetona e clorofórmio/metanol .....	50
Figura 30 – Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta antes (■) e depois (◆) da interseção das curvas .....	52
Figura 31 - Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido com o CACJ antes (●) e depois (▲) da interseção das curvas .....	52
Figura 32 - Exemplo de fotografia óptica tirada das emulsões formadas. ....	54
Figura 33 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão I, contendo apenas o biossurfactante produzido (6 g.L <sup>-1</sup> ) a partir de glicerina bruta. __ 1° Dia Último dia (45° Dia) .....	56
Figura 34 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão II, contendo o biossurfactante (4,8 g.L <sup>-1</sup> ) produzido a partir de glicerina bruta e goma arábica (1,2 g.L <sup>-1</sup> ). __ 1° Dia Último dia (45° Dia) .....	56
Figura 35 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão III, contendo 3 g.L <sup>-1</sup> do biossurfactante produzido com glicerina bruta e 3 g.L <sup>-1</sup> de Goma Arábica. __ 1° Dia Último dia (45° Dia).....	57
Figura 36 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão IV, contendo apenas o emulsificante Goma Arábica (6 g.L <sup>-1</sup> ).__ 1° Dia Último dia (45° Dia).....	57
Figura 37 – Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão I, contendo 6 g.L <sup>-1</sup> do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta ....	58

Figura 38 - Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão II, contendo $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta e $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ de Goma Arábica .....	58
Figura 39 - Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão III, contendo $3 \text{ g.L}^{-1}$ do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta e $3 \text{ g.L}^{-1}$ de Goma Arábica.....	59
Figura 40 - Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão IV, contendo $6 \text{ g.L}^{-1}$ de Goma Arábica .....	59

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.....	8
Tabela 2 - Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos.....	10
Tabela 3 – Potenciais aplicações de biosurfactantes.....	11
Tabela 4 – Valores médios observados no pH e nos principais componentes da glicerina bruta produzida em 16 usinas de biodiesel no Brasil. ....	17
Tabela 5 - Composição do suco de caju clarificado .....	31
Tabela 6 - Solventes utilizados na extração do biosurfactante com suas respectivas proporções .....	32
Tabela 7 - Concentração dos biosurfactantes utilizados para cada uma das emulsões preparadas com tampão de acetato e n-hexadecano .....	39
Tabela 8 - Parâmetros obtidos na produção de biosurfactante por <i>Y. lipolytica</i> utilizando CACJ e glicerol bruto como fonte de carbono .....	47
Tabela 9 - Concentração de proteínas do biosurfactante produzido a partir da glicerina bruta.....	51
Tabela 10 - Concentração de proteínas do biosurfactante produzido a partir de CACJ	51
Tabela 11 – Exemplos de emulsificantes e suas respectivas CMCs.....	53
Tabela 12 - Amplitudes e picos das Gaussianas do primeiro e do último dia de análise de estabilidade .....	55

# INTRODUÇÃO

---

Surfactantes são compostos amplamente utilizados nas indústrias devido às suas propriedades emulsificantes e surfactantes, sendo capazes de alterar a tensão superficial e interfacial de um líquido, servindo de matéria-prima para uma grande quantidade de produtos químicos (ZINJARDE e PANT, 2002). No entanto, a maioria dos surfactantes atualmente utilizados pelas indústrias é de origem sintética e, portanto, nociva ao meio ambiente. Além de serem tóxicos, os surfactantes sintéticos não são biodegradáveis e seu acúmulo na biosfera gera poluição e contaminações prejudiciais à saúde dos seres vivos (MORITA *et al.*, 2007).

Com o intuito de buscar produtos menos agressivos ao meio ambiente e, assim, amenizar os danos causados pelos surfactantes na biosfera, vem sendo estudado nas últimas décadas o desenvolvimento de surfactantes microbianos (biossurfactantes), junto às suas diversas oportunidades de aplicação (BANAT *et al.*, 2000).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica e constituem uma classe de surfactantes que são produzidos a partir de organismos vivos (SINGH e CAMEOTRA, 2004).

Uma vantagem apresentada pelos biossurfactantes produzidos a partir de micro-organismos com status GRAS (generally regarded as safe), como é o caso da levedura *Yarrowia lipolytica*, é a sua possibilidade de utilização em aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica, pois estes não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, ao contrário dos emulsificantes produzidos a partir da indústria petroquímica e de micro-organismos patogênicos (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Apesar de apresentarem diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como biodegradabilidade e abrangência de sua aplicação a todas as áreas da indústria química, os biossurfactantes ainda não são amplamente utilizados. Isto se deve aos altos custos de sua produção, associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros, tornando-os, na atual circunstância, incapazes de competir economicamente com os emulsificantes químicos (BANAT *et al.*, 2000).

O problema econômico da produção dos biossurfactantes pode ser contornado através do uso de fontes alternativas de nutrientes, como os resíduos agroindustriais, facilmente disponíveis e de baixo custo, uma vez que o meio de cultivo representa

aproximadamente 50% do valor do produto final (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002). Os resíduos agroindustriais apresentam um grande potencial como matéria-prima para produção de biossurfactante, uma vez que são ricos em nutrientes, de baixo custo e biodegradáveis (FONTES, 2008).

Nesse âmbito, dois resíduos industriais com potencial para servirem de matéria-prima para o crescimento da levedura *Y. lipolytica* são a glicerina oriunda da produção do biodiesel e o rejeito agroindustrial de caju, pois ambos são descartados em grandes quantidades pelas indústrias e, portanto, apresentam baixo valor agregado, o que pode diminuir os custos de produção de biossurfactantes em larga escala.

Neste contexto, este trabalho visa dar continuidade àquele desenvolvido por Fontes (2008), no qual se vislumbrou o potencial das matérias-primas glicerina bruta e suco de caju como fonte de carbono para crescimento da levedura *Y. lipolytica* e produção de biossurfactante através da otimização de ambos os meios de produção. Dessa forma, procurou-se nesse trabalho produzir e purificar o biossurfactante utilizando sistemas de solventes diferenciados e, em seguida, caracterizá-lo. A capacidade do biossurfactante de estabilizar emulsões também foi estudada através de análise digital de imagem.

# OBJETIVOS

---

Este trabalho tem por objetivo produzir, caracterizar e avaliar a capacidade de estabilização de emulsões do biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

Para alcançar o objetivo geral do projeto, estudos foram previstos nas seguintes áreas:

- Avaliar o crescimento celular e acompanhar a produção de biossurfactantes pela levedura *Y. lipolytica*;
- Estudar a extração biossurfactante do meio de cultivo;
- Caracterizar parcialmente o biossurfactante produzido;
- Avaliar os mecanismos de envelhecimento de emulsões óleo em água (O/A) formuladas com o biossurfactante produzido por *Y. lipolytica* em meio de cultivo contendo glicerina bruta e em meio contendo suco de caju clarificado (CACJ, sigla do inglês, *clarified cashew apple juice*) como agente emulsionante através de análise digital de imagem;

# CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

## 1.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são tenso-ativos que atuam na diminuição da tensão interfacial ou superficial de um sistema contendo duas fases imiscíveis. O termo “interface” indica o limite entre as duas fases imiscíveis, e o termo “superfície” indica uma interface onde uma fase é líquida e a outra é gasosa, geralmente ar. A quantidade mínima de trabalho para criar a interface é chamada de energia interfacial livre, medida por unidade de área, quando a tensão superficial entre as duas fases é determinada (SANTOS *et al.*, 2007).

A definição da palavra surfactante é baseada na contração da frase em inglês que descreve “surface-active agents”, o que significa que estes possuem uma superfície ativa, devido à concentração de determinadas espécies em uma região interfásica: ar-água, óleo-água ou sólido-líquido (MANIASSO, 2001). No caso da mistura óleo e água, os surfactantes formam diferentes tipos de emulsão e podem ser sintéticos, produzidos a partir de derivados de petróleo, ou naturais, produzidos a partir de micro-organismos (VIDAL *et al.*, 2010).

Os tenso-ativos, em geral, apresentam um segmento de sua molécula com propriedades hidrofílicas e outro segmento lipofílico (SINGH e CAMEOTRA, 2004), servindo para compatibilizar a mistura de água com óleos, formando emulsões. A capacidade de ligação dessas partes é variável e um produto de interface pode ter um segmento hidrofílico pequeno e um lipofílico grande, ou vice-versa (QUEIROZ *et al.*, 2008).

A porção apolar dos surfactantes é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A estrutura básica de um surfactante é ilustrada na Figura 1, onde se pode observar uma porção polar acoplada de uma cadeia de carbono apolar.

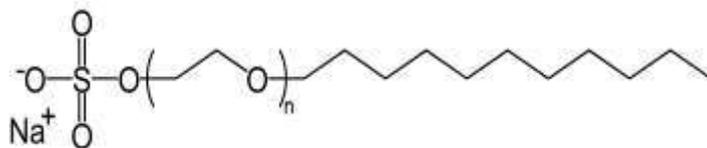


Figura 1 - Estrutura molecular do surfactante Lauril Éter Sulfato de Sódio.  
Fonte: Bessa (2009)

Na Figura 2, tem-se uma porção da estrutura molecular da Goma arábica, um exemplo de um emulsificante utilizado industrialmente e que também foi utilizado neste trabalho.

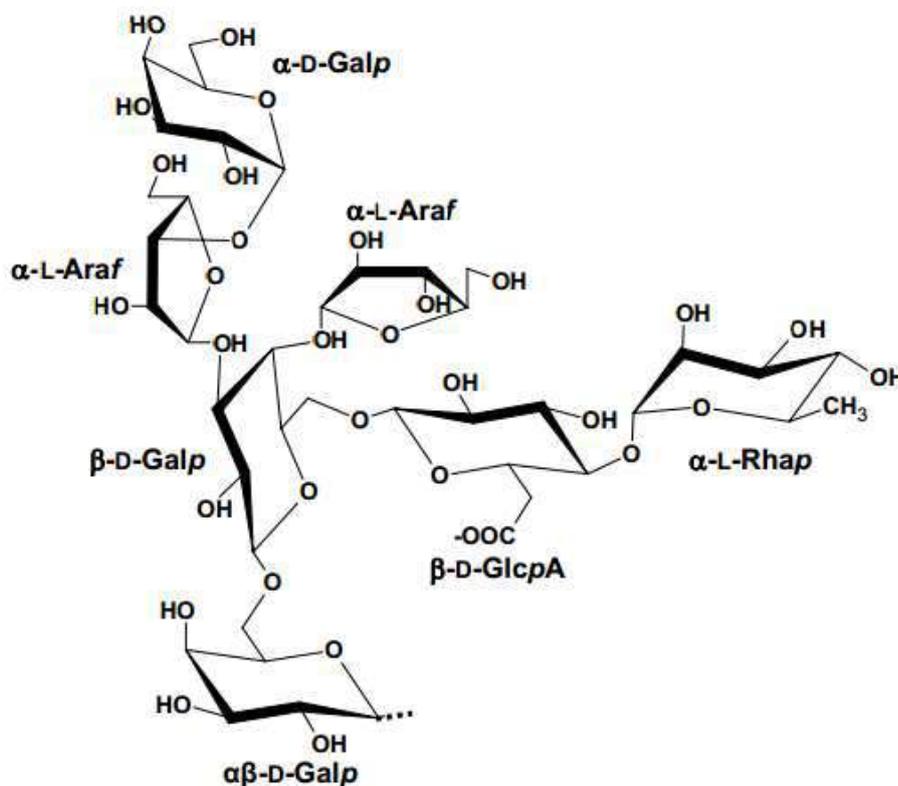


Figura 2 - Estrutura química do heptassacarídeo isolado da goma arábica.  
Fonte: Tosin (2008)

A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces e consequente redução da tensão interfacial e superficial são responsáveis pelas propriedades únicas dos surfactantes, como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Devido a estas propriedades, os surfactantes são utilizados como matéria-prima para uma vasta quantidade de produtos químicos (ZINJARDE e PANT, 2002), que se concentram nas indústrias de: petróleo, cosméticos, produtos de higiene e

limpeza (BANAT *et al.*, 2000), sendo utilizados, portanto, tanto em escala doméstica quanto industrial (MAKKAR *et al.*, 2011).

O consumo de surfactantes vem crescendo significativamente nos últimos anos em todo o mundo. Segundo Banat *et al.* (2000), a produção mundial de surfactantes excedia 3 milhões de toneladas no referido ano. Van Bogaert *et al.* (2007) estimaram uma produção de 10 milhões de toneladas de surfactantes no dado ano. Segundo a revista Ceresana Research (2012), a produção global de surfactantes continuará a aumentar, apresentando um crescimento anual de 4,5% até 2018, quando as suas rendas serão superiores a 41 bilhões de dólares.

Atualmente, a Ásia é a maior consumidora de surfactantes no mundo, com 37% do mercado mundial, seguida pela América do Norte e pela Europa ocidental. Porém, esse quadro tende a mudar nos próximos anos devido ao crescente consumo de surfactantes em outros continentes, inclusive na América Latina, principalmente pelo Brasil (CERESANA RESEARCH, 2012). A análise do relatório brasileiro do mercado de surfactantes revelou que o mercado nacional obteve receitas de mais de 1,31 bilhões de dólares em 2011 e a companhia Frost & Sullivan espera que este número chegue a 1,9 bilhões de dólares em 2018 (COSMETIC BUSINESS, 2012).

Atualmente, muitos surfactantes são sintetizados quimicamente a partir do petróleo. Nos países industrializados, a produção de surfactantes se dá majoritariamente (de 70 a 75%) através da síntese química. No entanto, os surfactantes sintéticos apresentam diversos problemas ao serem lançados no meio ambiente. Por serem tóxicos, o acúmulo destes surfactantes na biosfera gera poluição e contaminações prejudiciais à saúde dos seres vivos (MORITA *et al.*, 2007).

Os surfactantes sintéticos, além de serem sintetizados por um processo de produção ambientalmente nocivo, apresentam baixa biodegradabilidade, o que limita seu uso em diversas aplicações industriais e ambientais, como nas indústrias de alimentos e bebidas (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

O crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado a novas legislações de controle do meio ambiente, levou à procura por produtos menos agressivos ao meio ambiente e, assim, amenizar os problemas causados pelos surfactantes na biosfera. Nessa perspectiva, vem sendo estudado nas últimas décadas o desenvolvimento de surfactantes microbianos ou naturais (biossurfactantes), junto às suas várias oportunidades de aplicação, como uma alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BANAT *et al.*, 2000; DAVIS e LYNCH, 1999).

## 1.2 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes ou surfactantes biológicos constituem uma classe de surfactantes sintetizados a partir de organismos vivos, desde plantas (saponinas), microorganismos (biossurfactantes), até humanos (sais biliares) (BOGNOLO, 1999). Quando produzidos a partir de microorganismos, os biossurfactantes podem ser encontrados em superfícies de células microbianas ou secretados extracelularmente como subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE e PASTORE, 2002). São compostos produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microorganismos através da degradação de vários substratos, incluindo carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes (PIRÔLLO, 2006).

Os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (COLLA e COSTA, 2003) sendo que as estruturas básicas são mostradas na Figura 3. Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água, e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (BARATHI e VASUDEVAN, 2001).

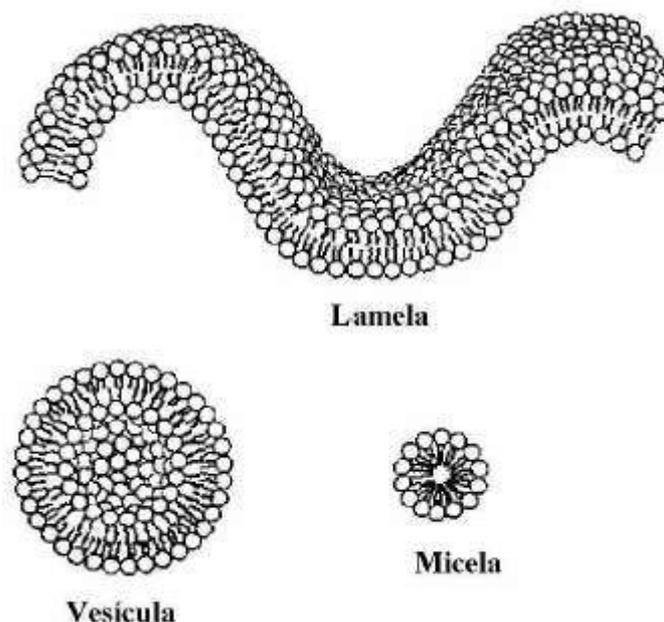


Figura 3 - Estruturas básicas formadas por biossurfactantes  
Fonte: Champion *et al.* (1995)

Biossurfactantes surgiram como candidatos naturais e promissores para a substituição de emulsificantes sintéticos, devido às suas propriedades intrínsecas, tais como: baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, alta capacidade de formação de espuma e maior atividade em temperaturas extremas, suportando diversos níveis de pH e de salinidade (BANAT *et al.*, 2000). Além disso, os biossurfactantes são tão estáveis quanto os de origem sintética, podendo ser utilizados nos mesmos processos industriais, com evidentes benefícios para o ambiente (MARTINS, 2011), pois estes não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, ao contrário dos emulsificantes produzidos a partir da indústria petroquímica (FONTES, 2008).

Os biossurfactantes possuem melhores propriedades do que muitos emulsificantes químicos, além de possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (MELO, 2011). Também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis, como por exemplo: efluentes agroindustriais, óleos vegetais, subprodutos da indústria do petróleo e alimentícia (MANEERAT, 2005), representando um ganho do ponto de vista da sustentabilidade em uma sociedade onde esta é vista com cada vez mais importância. Possuem ainda atividade biológica como antimicrobianos, antitumorais, entre outras (KITAMOTO *et al.*, 2002). A Tabela 1 ilustra alguns exemplos de surfactantes naturais e sintéticos.

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

<b>Naturais</b>	<b>Sintéticos</b>
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas Alquil sulfonatos	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de Etil/Propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Fonte: Nitschke e Pastore (2002)

Os biossurfactantes compreendem uma grande variedade de moléculas quimicamente diferentes, como: glicolípidos, liposacarídeos, fosfolípidos, ácidos graxos, lípidos e lipopeptídeos e alguns polímeros (MAIER, 2003). Os biossurfactantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos diferentes como, por exemplo, o Emulsan, no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos, ou o Liposan, de *Yarrowia lipolytica*, constituído por carboidratos e proteínas (NITSCHKE e PASTORE, 2002). A surfactina é um tipo de lipopeptídeo produzido por linhagens da bactéria *Bacillus subtilis* (BARROS *et al.*, 2007). Estes e alguns outros exemplos de biossurfactantes estão ilustrados na Figura 4.

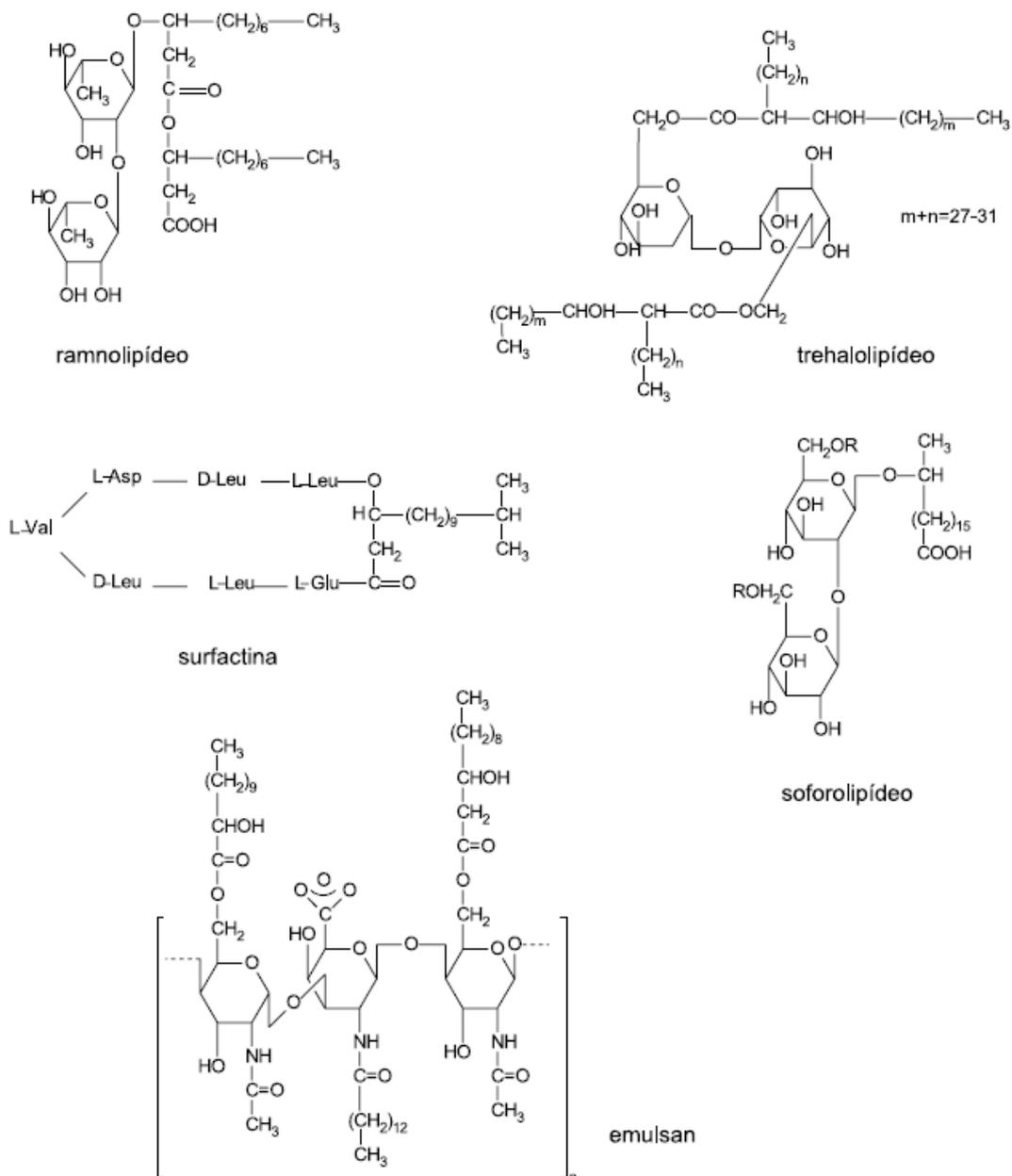


Figura 4 - Estruturas químicas de alguns biossurfactante  
 Fonte: Cameotra e Makkar (1998)

Uma grande variedade de microrganismos pode produzir biosurfactantes, sendo os mais conhecidos aqueles apresentados na Tabela 2. Os biosurfactantes mais conhecidos são os glicolipídeos, que consistem de carboidratos combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos de cadeia longa. Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais estudados, formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico (KRONEMBERGER, 2007).

Tabela 2 - Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos.

<b>Tipo de Surfactante</b>	<b>Micro-organismo</b>
<b>Glicolipídeos</b>	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apícola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
Peptídio-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: Nitschke e Pastore (2002)

As áreas de aplicação dos biosurfactantes são amplas devido às suas propriedades emulsificantes elevadas, aliadas ao fato de serem biodegradáveis e atóxicos. Estes fatores tornam os biosurfactantes muito úteis em vários setores

industriais, que incluem: petróleo, petroquímica, alimentos, bebidas, cosméticos, farmacêutica, mineração, metais, agroquímicos, fertilizantes, celulose, papel e ambiental, entre outras. A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Além de serem utilizados nessas grandes áreas da indústria química, os biossurfactantes vêm atraído o interesse da comunidade científica, que comprovou seus efeitos significativos em áreas diversificadas, como: biorremediação de solos altamente contaminados por zinco e cádmio (MULLIGAN *et al.*, 1999) e da água poluída (VOLKERING *et al.*, 1997); biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (CUBITTO *et al.*, 2004; MORÁN *et al.*, 2000) e de petróleo (DA CRUZ, 2012); substituição de solventes clorados utilizados para a limpeza de tubos contaminados (TOREN *et al.*, 2001) e formação de emulsões estáveis em óleo (COSTA, 2005).

Nas indústrias de cosméticos, uma larga quantidade de biossurfactantes é utilizada em uma grande variedade de produtos, servindo como: emulsificantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes umidificantes e de limpeza. Vários produtos contêm biossurfactantes na sua formulação, como por exemplo: repelentes, xampus e condicionadores, soluções para lentes de contato, pastas de dente, cremes faciais, entre outros (PROMMACHAN, 2002; MAKKAR E CAMEOTRA, 2002).

A Tabela 3 apresenta algumas das potenciais aplicações dos biossurfactantes de acordo com a sua principal função.

Tabela 3 – Potenciais aplicações de biossurfactantes.

<b>Função</b>	<b>Aplicação</b>
Dispersantes e emulsificantes	Cosméticos, tintas, aditivos para óleo
Solubilizantes e microemulsões	Produtos farmacêuticos
Agentes umectantes	Indústria têxtil, tintas e fármacos
Detergentes	Produtos agrícolas e domésticos
Agentes espumantes	Cosméticos e produtos para flotação
Agentes seqüestrantes de metais	Mineração
Demulsificantes	Tratamento de resíduos líquidos
Agentes redutores de viscosidade	Transporte de óleo cru através de tubulações

Fonte: Banat *et al.* (2000)

Apesar de suas diversas vantagens e inúmeras áreas de aplicação, os altos custos de produção dos surfactantes naturais, associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros, ainda os tornam, na atual circunstância, incapazes de competir economicamente com os emulsificantes químicos e, por esta razão, estes ainda são mais comercializados atualmente (CARA, 2009; BANAT *et al.*, 2000).

O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo (ROCHA *et al.*, 2006). O uso de substratos alternativos como resíduos agroindustriais, pode contribuir para a redução de custos uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30% do valor do produto final (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

Segundo Mukherjee *et al.* (2006), três estratégias básicas têm sido adotadas para reverter este quadro e tornar os surfactantes naturais mais competitivos:

(i) uso de substratos residuais e de baixo custo;

(ii) desenvolvimento de processos eficientes, incluindo otimização de condições de cultivo, adoção de processos de separação e recuperação de baixo custo;

(iii) desenvolvimento e utilização de linhagens mutantes ou recombinantes, visando melhorar o rendimento da produção desses biossurfactantes.

Decesaro *et al.* (2013), com o intuito de viabilizar o uso comercial dos biossurfactantes, utilizaram como micro-organismos produtores *Pseudomonas* e *Bacillus* isolados de locais contaminados com resíduos oleosos, por estes possuírem baixo custo. Os autores comprovaram que o estudo poderia contribuir na redução do custo da produção dos biossurfactantes, principal barreira ao seu uso em maior escala.

Oliveira *et al.* (2006) conseguiram obter quantidades consideráveis de ramnolipídio pelo cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* FR. a partir de óleo de dendê e N:P:K (10:10:10), visando um alto rendimento para compensar o alto custo de produção dos biossurfactantes.

Há atualmente um estudo no Fraunhofer-IGB (Instituto para Engenharia Interfacial e Biotecnologia de Fraunhofer) na Universidade de Stuttgart (Alemanha), denominado BioSurf, que visa a ampliação da produção de biossurfactantes em larga escala, com o intuito de diminuir o uso majoritário dos surfactantes sintéticos. O instituto visa aplicações nas áreas de medicina, farmácia, química, meio ambiente e energia (RUPP e ZIBEK, 2011).

### 1.3 *YARROWIA LIPOLYTICA*

*Y. lipolytica* é um micro-organismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*, sendo geralmente isolada de ambientes contaminados por compostos oleosos, como a Baía de Guanabara (AMARAL *et al.*, 2006). É uma das espécies não convencionais mais estudadas nos dias atuais pela sua capacidade de metabolizar hidrocarbonetos e lipídeos e pelo seu dimorfismo, que lhe confere a habilidade de migrar entre as formas de levedura, pseudo-hifa (cadeia de células alongadas com constrições visíveis posicionando o septo) e hifa (filamentos lineares sem constrições visíveis) (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2000; DUTRA, 2010).

Segundo Coelho *et al.* (2010), a transição de levedura para hifa está associada ao crescimento unipolar, à divisão assimétrica, à grandes vacúolos fortemente polarizados localmente e à repressão de separação de células após a divisão. Acredita-se que o dimorfismo da levedura está relacionado com um mecanismo de defesa para condições adversas, tais como a temperatura e as alterações nutricionais. A Figura 5 ilustra a morfologia microscópica da *Y. lipolytica*, aonde é possível observar as células na forma de leveduras e também algumas hifas e pseudo-hifas.



Figura 5 - Morfologia microscópica de *Y. lipolytica*  
Fonte: Sweedman *et al.* (2013)

*Y. lipolytica* é considerada um micro-organismo não patogênico e diversos processos baseados nesta levedura foram classificados com status GRAS (generally

recognized as safe) pela Food and Drug Administration (FDA), EUA, permitindo que a mesma seja empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

A gama de substratos utilizados por *Y. lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose) (BARBOSA, 2011). Além disso, possui vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e exibe crescimento ótimo a 28°C (FONTES, 2008), embora seja capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura, que se estende de 5 a 32°C (FICKERS *et al.*, 2005).

Quanto ao metabolismo, *Y. lipolytica* apresenta características bioquímicas distintas, como a sua capacidade de produzir diversos intermediários metabólicos e de realizar a biossíntese de peroxissomas, bem com a sua intensa atividade secretora de proteínas e ácidos orgânicos e (SZABO, 2002), o que justifica os estudos para aplicar essa espécie industrialmente (como biocatalisadora) em biologia molecular e em estudos genéticos (KAWASE *et al.*, 2003).

Dujon (2004) determinou a sequência genômica de todo o cromossomo seis de *Y. lipolytica*, possibilitando, assim, estudos de vários genes responsáveis pela expressão de proteínas, enzimas e até mesmo das moléculas de biossurfactantes produzidas pela levedura com interesse industrial, aumentando a expressão de seus produtos metabólicos via engenharia genética.

Amaral *et al.* (2006) isolaram um novo biossurfactante, denominado Yansan. Este foi secretado durante crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono. O Yansan apresentou alta atividade de emulsificação, mostrando que a produção de biossurfactante não se dá apenas em meio hidrofóbico.

Outro trabalho relatado na literatura foi desenvolvido por Sarubbo *et al.* (2001), no qual os autores também utilizaram glicose para a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*.

Souza *et al.* (2012), produziram biossurfactante a partir da *Y. lipolytica* em água marinha, utilizando óleo diesel como fonte de carbono, mostrando a diversidade de meios de cultivo em que essa espécie pode crescer.

Fontes *et al.* (2012) estudaram a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando glicerina bruta e suco de caju clarificado como fontes de carbono, obtendo bons resultados para o biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta.

## 1.4 FONTES DE CARBONO DE ORIGEM RENOVÁVEL

### 1.4.1. GLICERINA BRUTA COMO FONTE DE CARBONO

Glicerol é o nome popular do 1,2,3-propanotriol, um poliálcool existente na natureza em vegetais (soja, mamona, babaçu e girassol), em animais, e também em formas combinadas de glicerina com alguns ácidos graxos (THOMPSON e HE, 2006), cuja fórmula estrutural está ilustrada na Figura 6.

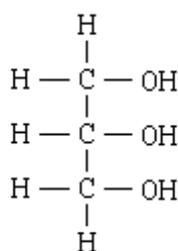


Figura 6 - Estrutura molecular do glicerol  
Fonte: Lorena (2013)

Descoberto acidentalmente pelo químico sueco Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva (ARRUDA *et al.*, 2007), o glicerol é um composto higroscópico (possui capacidade de absorver umidade), inodoro, bastante viscoso, de sabor levemente adocicado e seu estado é líquido à temperatura ambiente (25°C) (KIRK-OTHMER, 2007).

Em micro-organismos, o glicerol apresenta um papel fundamental no controle no metabolismo, na medida em que é responsável pela regulação de diversos mecanismos bioquímicos intracelulares (CHAVÉZ, 2008). É uma substância com diversas aplicações nas indústrias química, de alimentos e terapêutica, sendo ainda empregado para produção de resinas e poliésteres devido à sua reatividade polifuncional, e também como lubrificante na indústria têxtil (ZHOU *et al.*, 2008).

Na produção de biodiesel pelas indústrias petroquímicas, aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol, uma vez que este é o principal componente da glicerina bruta, importante subproduto gerado no processo de transesterificação do biodiesel (DASARI *et al.*, 2005).

A transesterificação do biodiesel consiste na reação de um triglicerídeo (óleo vegetal ou gordura animal) com um álcool de cadeia curta (metílico ou etílico) na presença de um catalisador (hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio) para acelerar



A glicerina bruta derivada da reação de transesterificação possui baixo teor de pureza, o que lhe confere um baixo valor agregado. Sua composição contém um grande volume de ácidos graxos saponificados, catalisador e água derivada do processo de transesterificação do biodiesel (VAN GERPEN, 2002).

A composição da fase glicerínica oriunda da produção do biodiesel varia largamente em função do processo de transesterificação e da eficiência da separação do biodiesel (FONTES, 2008). A Tabela 4 apresenta a composição da glicerina bruta através de valores médios observados em 16 usinas produtoras de biodiesel no Brasil.

Tabela 4 – Valores médios observados no pH e nos principais componentes da glicerina bruta produzida em 16 usinas de biodiesel no Brasil.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média</b>
Glicerol (%)	74,4
Umidade (%)	9,7
Lipídios totais (%)	7,8
Cinzas (%)	5,3
Sódio (g.kg-1)	20,8
Fósforo (mg.kg-1)	541
Cálcio (mg.kg-1)	36,2
pH	7,2

Fonte: Oliveira *et al.* (2013)

A transesterificação conduz à formação de produtos que se separam em duas fases líquidas. A Figura 9 ilustra o processo de transesterificação do óleo vegetal, que, sob influência de um catalisador reagindo com um álcool, produz biodiesel e glicerina.



Figura 9 - Foto de um funil de separação contendo as duas fases líquidas formadas pela reação de transesterificação do sebo bovino

Fonte: Boni (2008)

Biodiesel é definido como éster de ácidos graxos de cadeia longa (monoéster alquílico) derivado de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais (MEHER *et al.*, 2004).

O biodiesel surgiu no mercado mundial como uma alternativa promissora ao alto consumo de produtos derivados do petróleo, sendo um combustível alternativo e biodegradável, obtido de fontes limpas e renováveis, e que não emite compostos sulfurados, responsáveis pelas chuvas ácidas (PALOMINO-ROMERO *et al.*, 2012).

Em 2003, tiveram início os primeiros estudos concretos para a criação de uma política do biodiesel no Brasil e, em dezembro de 2004, o Governo lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) com o objetivo de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) sucessivamente até atingir 5% (B5) em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que introduz o biodiesel na matriz energética brasileira, sendo fixado em 5%, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional (PORTAL BRASIL, 2011).

Em 2011, a produção nacional de biodiesel foi de 2,7 bilhões de litros. Esse resultado credencia o Brasil como um dos maiores mercados mundiais de biodiesel, juntamente com a Alemanha e os Estados Unidos. Desde o lançamento do PNPB até o final de 2011, o Brasil produziu 8,3 bilhões de litros de biodiesel (PORTAL BRASIL, 2011). Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo), o Brasil produziu 1,2 bilhões de litros de biodiesel em 2008, gerando nesse processo 120.000 toneladas de glicerina (FARIA, 2010).

A produção do biodiesel vem crescendo consideravelmente nos últimos anos em função do aumento da preocupação mundial com o meio ambiente e da intenção de reduzir a dependência do petróleo importado (MELLO *et al.*, 2007). Com isto, a produção de glicerina bruta também irá aumentar e torna-se necessário a busca de alternativas para o uso desse resíduo, com o intuito de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerol (OOI *et al.*, 2004).

A criação de alternativas ambientalmente favoráveis para o uso de resíduos provenientes de fontes renováveis de energia é uma área com amplas possibilidades para pesquisa e investimento. Soluções que gerem produtos com valor agregado

economicamente vantajosos são um grande desafio para a pesquisa relacionada à agroenergia em todo o mundo. Alguns produtos que atualmente são derivados de petróleo podem, a princípio, ser produzidos biotecnologicamente por microorganismos que utilizam o glicerol. Isso traria benefícios econômicos e para o meio ambiente, pois promoveria o uso de biodiesel, reduziria a dependência do petróleo, diminuiria a emissão dos gases do efeito estufa e aumentaria a fabricação de produtos químicos, alimentos, rações, etc (FRANCO, 2011).

Rivaldi *et al.* (2008) descreveram estudos bem documentados sobre o mecanismo metabólico de glicerol por microrganismos e pertinentes com a proposta de utilização do glicerol em processos microbianos. Os autores também apresentaram novas estratégias que podem ser exploradas visando o aproveitamento deste material e sua bioconversão em bioprodutos de alto valor agregado.

Machado Junior (2010) estudou a conversão por via biotecnológica da glicerina gerada na síntese de biodiesel em biomassa para a levedura *Y. lipolytica* NRRL YB-423, e caracterizou a biomassa obtida, em termos de perfil de ácidos graxos e perfil de aminoácidos, encontrando resultados promissores.

Fontes (2008) atingiu bons resultados ao produzir biossurfactante por *Y. lipolytica* a partir de glicerina bruta, abrindo um leque de opções para viabilizar economicamente o processo de síntese do biossurfactante.

Da Silva *et al.* (2012), testaram a produção de ácido cítrico a partir de *Y. lipolytica* utilizando diferentes concentrações de glicerina bruta em diferentes fontes de nitrogênio e obtiveram como resultado a maior produção de ácido cítrico na menor concentração de glicerina bruta utilizada no trabalho e na ausência de sulfato de amônia.

De Almeida *et al.* (2011) verificaram a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) utilizando glicerol e óleo de fritura como fonte de carbono. Os autores concluíram que o glicerol foi a melhor fonte de carbono, com efeito significativo sobre a produção de extrato bruto de biossurfactante.

#### 1.4.2. SUCO DE CAJU COMO FONTE DE CARBONO

O cajueiro é uma planta tropical, originária do Brasil, pertencente à família *Anacardiaceae*, *Dicotyledonea* e ao gênero *Anacardium*, dispersa em quase todo o território brasileiro. O caju (Figura 10) compõe-se da castanha, que é o fruto, e do pedúnculo, considerado pseudofruto (FONTES, 2008).

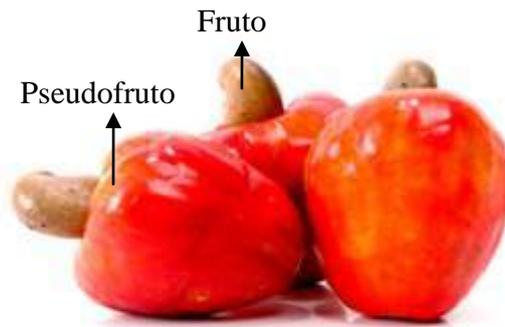


Figura 10 - Fruto e pseudofruto do caju  
Fonte: Maciel (2013)

O Nordeste do Brasil é o principal habitat nacional dos cajueiros. 84% da castanha de caju é produzida em apenas três estados: Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. Nestes locais, a cajucultura destaca-se, no contexto sócio e econômico, pelo valor nutritivo e comercial dos seus produtos, que garantem uma expressiva renda a partir da castanha de caju, porção de alto valor agregado do caju (SOUZA *et al.*, 2002). Esta produção gera uma grande quantidade de resíduo agroindustrial todos os anos, pois apenas uma pequena parte do pedúnculo produzido é aproveitada industrialmente (em torno de 2-6%) (CAMPOS *et al.*, 2002). Os produtos processados industrialmente são basicamente consumidos pelo mercado local e não apresentam papel importante na economia regional (ROCHA, 2007).

A grande quantidade desperdiçada (94 a 92%) apresenta elevado potencial para aplicação industrial, sendo uma matéria-prima rica em carboidratos (açúcar e amido), fibras, vitaminas e sais minerais. Desta forma, pode-se considerar o pedúnculo de caju como um substrato nobre e de baixo custo, aproximadamente R\$ 1,00/Kg (ROCHA, 2007).

Segundo Pinho (2009), o pedúnculo de caju apresenta ainda alto valor nutritivo, sendo um dos frutos mais ricos em vitamina C, com 156-387 mg/100 g, e rico em minerais como cálcio, ferro e fósforo, além de compostos fenólicos principalmente taninos, carotenóides e antocianinas, pigmentos naturais responsáveis por sua coloração característica, amarelo ou vermelho presentes principalmente na película.

Dentre os fatores que influenciam o elevado desperdício do pedúnculo de caju estão o curto período de pós-colheita, associado à pequena capacidade de aproveitamento pela indústria, curto período de safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima (PAIVA *et al.*, 2000). Todo esse

desperdício pode ser revertido através da utilização do pedúnculo de caju em novas aplicações biotecnológicas.

Honorato *et al.* (2007) utilizaram o suco de caju clarificado como substrato para o cultivo de *Leuconostoc mesenteroids* e biossíntese de produtos biotecnológicos de alto valor agregado. O suco de caju demonstrou ser um bom substrato para o crescimento do micro-organismo e produção de dextrana, ácido láctico, manitol e oligossacarídeos.

Rocha (2010) produziu bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) através de fermentação submersa, mostrando a como a exploração do caju como fonte de carbono pode criar uma alternativa ao uso da cana-de-açúcar na produção de etanol e proporcionar uma redução no custo da produção deste.

Vivek *et al.* (2013) estudaram o potencial anti-bactericida do suco de caju contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus mutans* isolados clinicamente e concluíram que o suco de caju apresenta potencial para inibir patogenicidades humanas.

O pedúnculo de caju também já foi utilizado para produzir vinho (MOHANTY *et al.*, 2006) e biossurfactante por *Y. lipolytica* (FONTES, 2008) e *Bacillus subtilis* LAMI008 (ROCHA *et al.*, 2009).

## 1.5 TENSÃO SUPERFICIAL

Tensão superficial é a propriedade que um líquido possui de manter as moléculas unidas na sua superfície, sendo uma consequência das forças intermoleculares. No interior do líquido, cada molécula é atraída por outras moléculas em todas as direções do espaço, enquanto as moléculas superficiais estão submetidas somente à tensão das moléculas que estão abaixo destas. A tensão superficial pode ser definida como a força que atua sobre a superfície por unidade de comprimento da área perpendicular à ela. A tensão superficial da água é muito forte, devido às pontes de hidrogênio intermoleculares, e é responsável pela formação de gotas, borbulhas e meniscos. Nas interfaces água/óleo e ar/água, a tensão superficial pode ser facilmente medida utilizando-se um tensiômetro. A tensão da água destilada é 72 mN/m, e a adição do surfactante é capaz de reduzir esse valor (BARBOSA, 2011).

A Figura 11 mostra um esquema do comportamento do tenso-ativo na superfície do líquido e no seio da solução em função da tensão superficial.

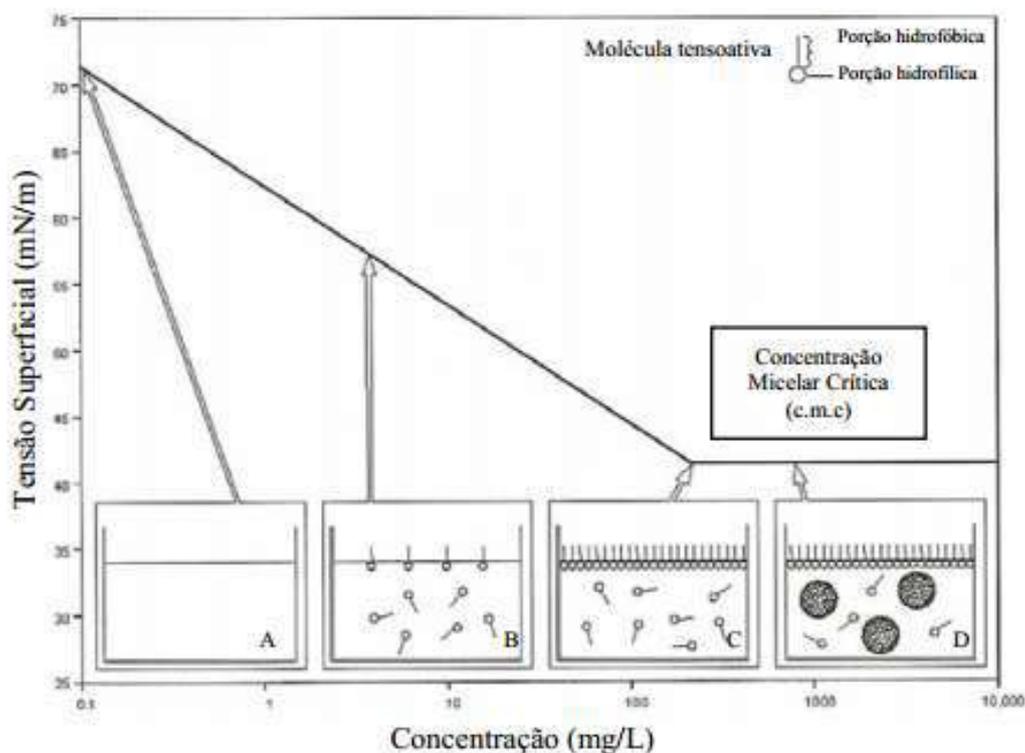


Figura 11 - Diminuição da tensão superficial da água em função da concentração de biossurfactante. Fonte: Santos *et al.* (2007)

Pode-se observar na Figura 11 a diminuição da tensão superficial de acordo com aumento na concentração de surfactante (situação B). Quando toda a superfície estiver coberta com o surfactante, tem-se a saturação do meio e as moléculas de surfactante começam a se agregar, formando micelas, na chamada concentração micelar crítica (CMC) (situação C e D) (SANTOS *et al.*, 2007).

A CMC é uma medida muito utilizada para a caracterização de surfactantes, sendo definida como a concentração mínima de moléculas de surfactantes presentes em um determinado líquido capaz de propiciar a formação de micelas, sendo uma importante característica de um surfactante (BARROS, 2007). A micela é a configuração das moléculas de surfactante com melhor estabilidade na solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas e a parte hidrofílica das moléculas voltada para a água. A Figura 12 ilustra a estrutura de uma micela, onde a porção polar do surfactante está voltada para a fase aquosa e a porção apolar emulsiona a fase orgânica.

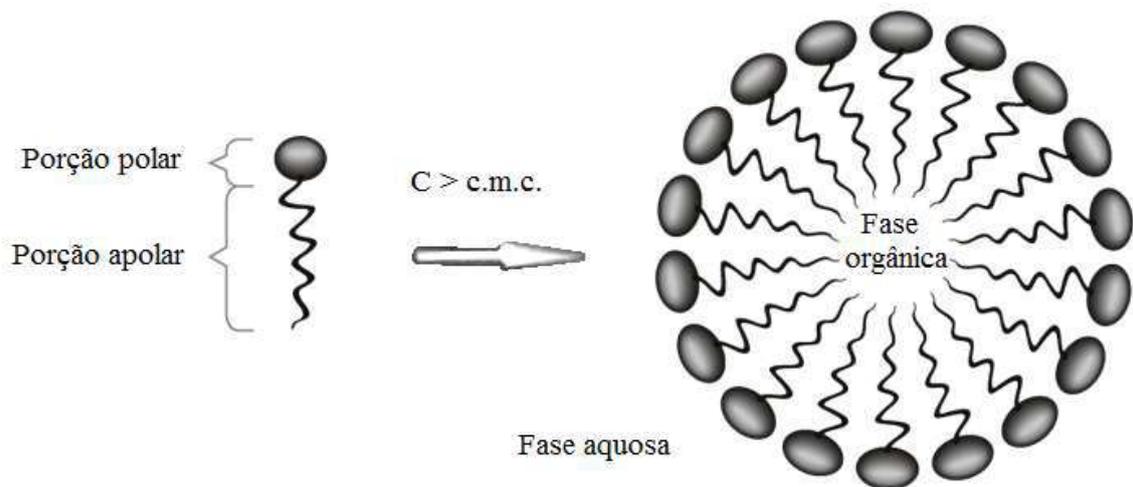


Figura 12 – Esquema de formação de uma micela esférica a partir da CMC  
Adaptada de: Gusev *et al.* (2009)

A CMC de um surfactante pode ser determinada através de mudanças bruscas no comportamento de algumas de suas propriedades físicas em solução, tais como: espalhamento de luz, viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial, pressão osmótica e capacidade de solubilização de solutos. Determinar a CMC é de fundamental importância para quaisquer processos envolvendo tenso-ativos, pois o efeito desses compostos é maior quando uma quantidade significativa de micelas encontra-se presente (SANTOS *et al.*, 2007).

## 1.6 EMULSÕES

Emulsões são misturas líquidas heterogêneas, constituídas de duas ou mais fases, normalmente não miscíveis entre si, mas que são mantidas em suspensão uma na outra, graças a uma forte agitação ou devido a emulsionantes que modificam a tensão superficial (IBGE, 2004). São dispersões coloidais nas quais pelo menos um de seus componentes apresenta uma dimensão no intervalo de 1 a 1000 nanômetros, sendo formadas por uma fase dividida, designada de interna, dispersa ou descontínua, e por uma fase que rodeia as gotículas, designada de externa, dispersante ou contínua (CONSIGLIERI, 2002; MARTINA, 2005).

De acordo com a natureza da fase dispersante, podem ser classificadas em: emulsão água em óleo (A/O), que contém água como fase dispersa sob a forma de pequenas partículas (maior que 0,1  $\mu\text{m}$ ) na fase oleosa; e óleo em água (O/A), em que a emulsão é composta pela dispersão de material oleoso/graxo na fase aquosa

(PIANOVSKI *et al.*, 2008). Por resultarem da mistura de dois líquidos imiscíveis entre si, emulsões formam um, necessitando da presença de um emulsificante para estabilizá-las.

Os biossurfactantes atuam como agentes estabilizadores de emulsão na medida em que promovem a dispersão entre duas fases inicialmente imiscíveis. Quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato, a tendência natural é a sua separação completa, a menos que seja aplicada uma força mecânica para dispersar um líquido no outro na forma de partículas finitas. Quando a força mecânica é removida, os dois líquidos puros tendem a separar-se, podendo esta separação demorar intervalos variáveis de tempo, desde poucos segundos a vários anos (GARCIA, 2008).

A Figura 13 mostra o mecanismo de formação de uma emulsão a partir da adição de energia e de um biossurfactante em um sistema contendo água e um hidrocarboneto. As moléculas de biossurfactante aderem à superfície das moléculas do hidrocarboneto, emulsionando-as, e permitindo a dispersão da fase apolar na fase polar (GARCIA, 2008).

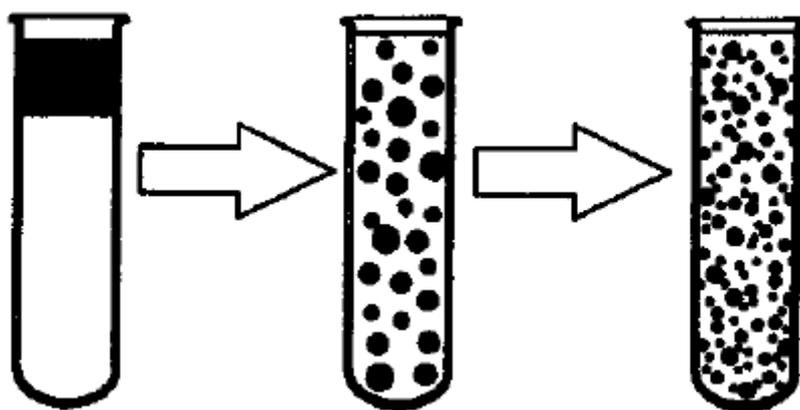


Figura 13 - Sistema heterogêneo de dispersão de um líquido imiscível  
Fonte: Garcia (2008)

As áreas de aplicação das emulsões são vastas, sendo estas muito utilizadas em cosméticos, para aplicação tópica, assim como em preparações farmacêuticas administradas por diferentes vias de administração (PIANOVSKI *et al.*, 2008).

As emulsões cosméticas e farmacêuticas são sistemas complexos, polidispersos contendo diferentes tensoativos de natureza química diversa e outros aditivos. A presença de filmes interfaciais estáveis já não pode ser considerada como o papel mais importante na estabilidade, mas outros mecanismos, entre os quais se destaca a formação de uma estrutura da fase contínua, que forma uma barreira reológica, evitando o movimento das gotículas (RIBEIRO, 2006). De acordo com o mesmo autor, os

tensoativos podem agir das seguintes formas para estabilizar as emulsões: estabilização eletrostática, estérica, por partículas sólidas e por misturas de emulsionantes.

Pianovski *et al.* (2008) utilizaram o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em na formulação de emulsões cosméticas, vislumbrando a sua aplicabilidade para a cadeia produtiva de produtos naturais e desenvolvimento sustentável.

## 1.7 MECANISMOS DE ENVELHECIMENTO

O termo estabilidade refere-se à habilidade da emulsão de resistir às modificações em suas propriedades ao longo do tempo: quanto mais estável, mais lentas serão as mudanças (McCLEMENTES, 1999). A estabilidade de uma emulsão pode ser estudada através da evolução e da distribuição do tamanho de micelas. O aumento no diâmetro médio de micela é um indicador da perda de estabilidade da emulsão e a taxa de crescimento das micelas revela o mecanismo responsável pela sua desestabilização.

Segundo Silva e Soares (1996), a perda da estabilidade de uma emulsão pode se manifestar das seguintes formas: cremosidade, onde as partículas menos densas sobem para o topo da formulação; floculação, onde a força de repulsão entre as moléculas é diminuída e estas se associam de maneira fraca e reversível por agitação; e por coalescência. A floculação pode ser evitada por simples agitação da emulsão, enquanto que a coalescência e a difusão molecular tratam-se de processos irreversíveis (FREIRE, 2005).

A redução da área interfacial é conseguida principalmente através de dois mecanismos: coagulação (seguido de coalescência) e de difusão molecular (SJÖBLOM, 1996).

Coalescência é a formação de uma grande micela a partir da fusão de micelas menores. Isto requer que as pequenas micelas entrem em contato, com afinamento e ruptura do filme que as cobre e é uma consequência direta do efeito de Kelvin, o que indica que a solubilidade de uma partícula é inversamente proporcional ao seu raio, o que significa que as moléculas individuais tendem a deixar partículas de menores dimensões e a se difundirem através da fase contínua para se juntarem às maiores (SILVA *et al.* 2010).

Degradação da emulsão por coalescência é caracterizada por um alargamento da distribuição de tamanho de partícula, com um aumento exponencial na dimensão média

de micelas com o tempo, de acordo com a teoria de Van Den Tempel (1953), representada pela Eq. 1:

$$\bar{a}^3 = \bar{a}_0^3 \exp(Kt) \quad (1)$$

onde:

$\bar{a}_0^3$  = raio médio inicial da partícula;

$\bar{a}^3$  = raio médio da partícula no tempo  $t$ ;

$K$  = constante de coalescência.

Há essencialmente um tratamento teórico conhecido como Teoria de Lifshitz-Slyozov-Wagner (LSW) e suas modificações, em que o mecanismo de difusão molecular é caracterizado por um crescimento linear do volume de micelas com o tempo (FREIRE, 2005).

De acordo com Silva *et al.* (2010) e Trindade *et al.* (2008), a degradação física das emulsões é devido à tendência espontânea para a redução da energia livre de Gibbs, obtida através da redução do tamanho da interface óleo/água e/ou da tensão interfacial entre o contínuo e as fases dispersas. As micelas de óleo são estabilizadas contra a floculação e a coalescência devido ao forte efeito de barreira estérica resultante de blocos de polissacáridos que se projetam a partir da superfície de micelas para a fase de emulsão contínua, onde são ancorados através do agrupamento lipídico e hidrofóbico do biossurfactante (DICKINSON, 2003).

Um aumento do volume da partícula é proporcional à solubilidade, ao coeficiente de difusão e à tensão interfacial da fase dispersa (óleo) na fase contínua (tampão). Portanto, as emulsões que se submetem à maturação de Ostwald podem ser estabilizadas através da diminuição de pelo menos um destes três fatores (FREIRE, 2005).

À medida que as emulsões se tornam instáveis, suas características físico-químicas variam. Para verificar tais variações pode-se determinar o valor do pH, viscosidade, densidade, condutividade elétrica, umidade, tamanho da partícula, entre outros (ANVISA, 2004).

Segundo Aulton (2005), a instabilidade de uma emulsão resulta de qualquer processo que cause um progressivo aumento do tamanho das partículas, e um alargamento na distribuição de tamanhos, de forma que as partículas dispersas podem tornar-se tão grandes a ponto de separar-se como líquido livre. Logo, um método

preciso para a determinação da estabilidade é avaliar o tamanho das micelas ao longo do tempo.

# CAPÍTULO 2: METODOLOGIA EXPERIMENTAL

---

## 2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona e extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose (*Reagen* – R.J., Brasil), agar-agar, uréia, sulfato de amônio e glicerol (*Vetec* – R.J., Brasil), hexadecano (*Sigma-Aldrich CO* (MO, USA)). Os solventes utilizados foram: clorofórmio, metanol, acetona e acetato de etila (*Vetec* – R.J., Brasil).

Os *kits* enzimáticos para dosagem de glicose e glicerol foram fornecidos pela Merck e Laborlab, respectivamente.

O suco de caju clarificado, a glicerina bruta e a tratada foram gentilmente cedidos pela professora Luciana Rocha Barros Gonçalves da Universidade Federal do Ceará. O suco de caju foi processado na Embrapa Agroindústria Tropical (Ceará). A glicerina bruta foi obtida de uma planta piloto do NUTEC - Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará - da empresa TECBIO. Foram utilizadas membranas em éster de celulose 0,45  $\mu\text{m}$  (*Millipore*, S.P., Brasil) e membranas de diálise Medicell Internacional LTDA.

### **Equipamentos:**

- Balança analítica marca OHAUS modelo Adventurer;
- Incubador rotatório, com agitação e controle de temperatura (Certomat BS-1)
- pHmetro Tecnal (modelo Tec-3MP);
- Liofilizador (Terroni modelo Enterprise 1);
- Centrífuga (Chriss modelo UJ1S);
- Ultra-Turrax (IKA T25 digital);
- Paquímetro (Vernier caliper);
- Câmera digital (Evolution VF cooled color);  
Espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800)
- Microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon);
- Tensiômetro K100 Krüss;

- Ultrafreezer (Coldlab, modelo CL120-80V)
- Capela de fluxo laminar equipada com luz UV - *Labconco*;
- Vórtex (Tecnal).

## 2.2. CONDIÇÕES DE MICRO-ORGANISMO E INÓCULO

### 2.2.1. MANUTENÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para realização dos experimentos foi utilizada a cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil. As células foram conservadas a 4°C após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio sólido YPD (“*Yeast Extract*, *Peptone*, *Dextrose*”) contendo (em p/v): extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar 2%.

### 2.2.2. OBTENÇÃO DO INÓCULO

A partir dos tubos contendo a levedura, inoculavam-se 200 mL de meio de cultivo YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) em *Erlenmeyers* de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório Certomat BS-1 (28°C, 160 rpm), a absorbância (570 nm) de uma amostra deste cultivo foi determinada e em seguida as células foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas, servindo de inóculo dos experimentos. A concentração inicial de células de aproximadamente  $1,0 \pm 0,1$  mg m.s. cel/mL foi utilizada em todos os experimentos.

## 2.3. PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A produção de biossurfactante foi realizada em *Erlenmeyers* de 1000 mL, contendo 500 mL do meio de cultura, em um agitador rotatório (Certomat BS-1) a 28°C e 250 rpm por 96 horas. Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para medidas do crescimento celular, pH, tensão superficial, índice de emulsificação do meio de cultivo e determinação da concentração de açúcares e glicerol, quando presentes. Antes de analisadas, as amostras eram primeiramente centrifugadas (3000 g por 5 min) filtradas em membrana de diâmetro de 0,45 µm para a remoção de células. Para tal, dois

meios de cultura distintos foram testados: um utilizando glicerol bruto como fonte de carbono e outro utilizando suco de caju clarificado, cuja composição é detalhada a seguir.

### 2.3.1. A PARTIR DE GLICERINA BRUTA

A glicerina utilizada neste trabalho é o co-produto da produção de biodiesel, resultante da transesterificação de óleo de rícino por metanol em meio alcalino (NaOH), e foi fornecida pela Empresa Brasileira de Bioenergia Ind. Com. Ltd. (EBB, Brasil). O pH da glicerina bruta foi ajustado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a fim de eliminar a alcalinidade da solução. Em seguida, a mesma foi aquecida a 100°C durante 1 h sob agitação, para eliminar o metanol. O sulfato produzido a partir da neutralização foi separado por decantação (SILVA *et al.* 2010b). Três por cento (v/v) de glicerina bruta foi adicionado ao meio de produção junto a 10 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e a 0,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

### 2.3.2. A PARTIR DE SUCO DE CAJU CLARIFICADO (CACJ)

O CACJ também foi utilizado como matéria-prima para a produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* neste trabalho. O CACJ foi obtido através de um processo mecânico e clarificado de acordo com Honorato *et al.* (2007). O pH do CACJ foi ajustado para 7,0 e, em seguida, este foi filtrado através de uma membrana de 0,45- $\mu$ m (Millipore Corp) e exposto à radiação ultravioleta durante 1 h para esterilização, a fim de evitar a perda de componentes termosensíveis.

Para compor o meio de cultivo, o CACJ foi diluído 10 vezes com água destilada e, como fonte de nitrogênio, foi adicionado sulfato de amônio a 10 g.L<sup>-1</sup>. Essa proporção foi utilizada para manter a relação de carbono/nitrogênio ótima de C/N (11,65), segundo Fontes *et al.* (2008). A suplementação de nitrogênio se fez necessária uma vez que o suco de caju clarificado apresenta baixa concentração de proteínas solúveis e totais, as quais servem como fonte de nitrogênio. A composição do CACJ é apresentada na Tabela 5, segundo Rocha (2007).

Tabela 5 - Composição do suco de caju clarificado

<b>Parâmetro</b>	<b>Concentração</b>
Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	43,67 ± 0,3
Frutose (g.L <sup>-1</sup> )	42,43 ± 0,1
Proteínas solúveis (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,10 ± 0,0
Proteínas Totais (mg.mL <sup>-1</sup> )	2,41 ± 0,0
Fósforo (g.L <sup>-1</sup> )	1,21 ± 0,0
Potássio (g.L <sup>-1</sup> )	13,13 ± 0,9
Cálcio (g.L <sup>-1</sup> )	< DL
Magnésio (g.L <sup>-1</sup> )	1,17 ± 0,1
Sódio (g.L <sup>-1</sup> )	0,09 ± 0,0
Enxofre (g.L <sup>-1</sup> )	0,81 ± 0,0
Cobre (mg.L <sup>-1</sup> )	< DL
Ferro (mg.L <sup>-1</sup> )	6,97 ± 2,7
Zinco (mg.L <sup>-1</sup> )	11,20 ± 4,3
Manganês (mg.L <sup>-1</sup> )	6,40 ± 0,4

pH = 4,32 ± 0,0  
 Fonte: Rocha (2007)

## 2.4 EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Após o cultivo de *Y. lipolytica* por 96 h em incubador rotatório, o meio de cultivo foi centrifugado (26.000 g) a 25°C por 20 minutos e filtrado em uma membrana de celulose triacetato (Millipore) de 0,45 µm a fim de se retirar as células. Para o isolamento do emulsificante, utilizou-se a técnica de Cirigliano e Carman (1984) com algumas modificações, utilizando membranas de diálise para concentrar o meio de cultivo livre de células. Para isto, aproximadamente 150 mL do extrato filtrado era transferido para uma membrana de diálise com 110 cm de comprimento, diâmetro de 4 cm e corte molecular de 12.000 Da. O extrato era concentrado para 25 mL através de diálise contra o ar à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas.

Para realizar a extração do biossurfactante, adicionava-se 25 mL do meio de cultivo concentrado e livre de células em um funil de separação e adicionava-se o solvente em pequenas quantidades, homogeneizando a mistura nos intervalos. O precipitado branco formado na fase aquosa era centrifugado (32.000 g) a 4°C por 30 minutos, dissolvido em 5 mL de água destilada e congelado em ultra-freezer a -50°C,

para posterior liofilização. Com intuito de obter o melhor rendimento na extração, diferentes sistemas de solventes foram avaliados, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Solventes utilizados na extração do biossurfactante com suas respectivas proporções

<b>Solvente</b>	<b>Proporções (meio de cultivo/solvente)</b>
Acetato de etila	1:1
Acetona	1:3
Clorofórmio/metanol	1:1:1, 1:2:2, 1:4:4, 1:8:8

A Figura 14 representa o fluxograma completo do processo de produção dos biossurfactantes.

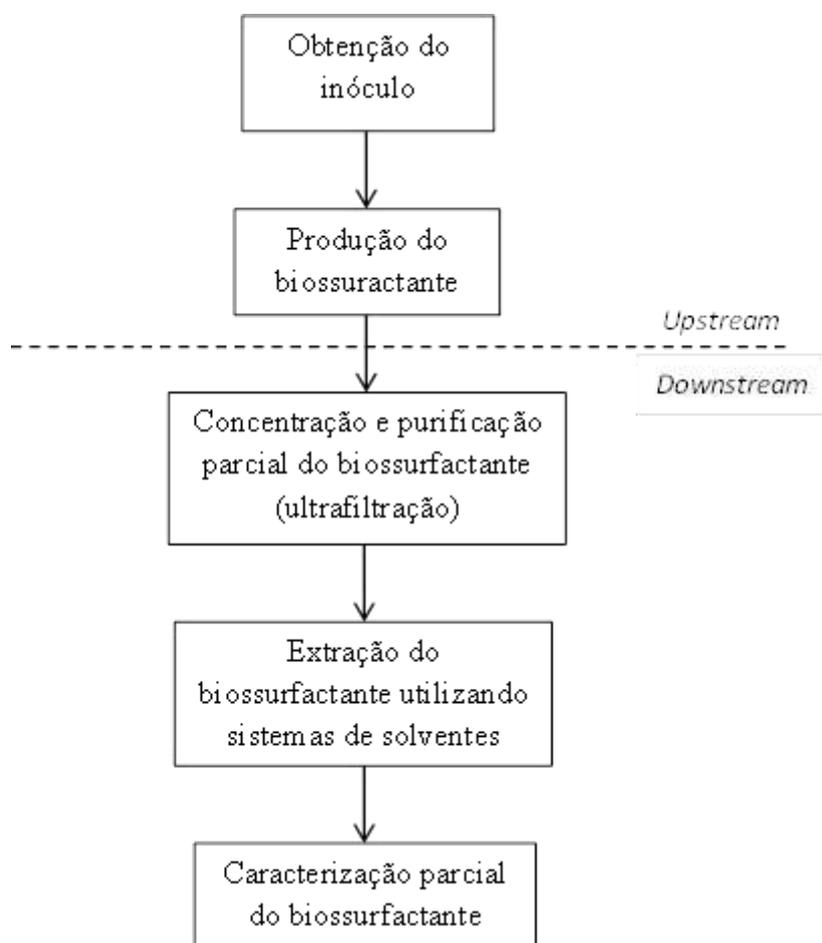


Figura 14. Fluxograma completo do processo de obtenção dos biossurfactantes

## 2.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Dois métodos foram utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante durante as 96 h de experimento: medida da tensão superficial e o outro a partir do índice de emulsificação do meio de cultivo livre de células.

### 2.5.1. TENSÃO SUPERFICIAL

A determinação da tensão superficial foi realizada utilizando o tensiômetro K100 Krüss, segundo o método do anel De Nöuy (FONTES, 2008). Para cada amostra analisada, foram necessários 30 mL de sobrenadante livre de células, mantido a 30°C. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura.

As análises foram realizadas no laboratório de Sistemas Particulados – EQ-UFRJ, sob responsabilidade do professor Márcio Nele de Souza.

### 2.5.2. ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE)

O índice de emulsificação foi realizado segundo Cooper e Goldenberg (1987), com algumas modificações. Este procedimento consistiu em colocar 1 mL do meio de cultura fermentado e livre de células em tubo de ensaio, adicionando o mesmo volume de hexadecano, seguidos por agitação em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas, calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total de amostra presente no tubo de ensaio (Eq. 2).

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \quad (2)$$

onde:

$E_{24}$  = IE após 24 h;

$H_{el}$  = altura da emulsão;

$H_s$  = altura total

A Figura 15 ilustra o procedimento para realizar a medição do IE dos meios de cultivo.

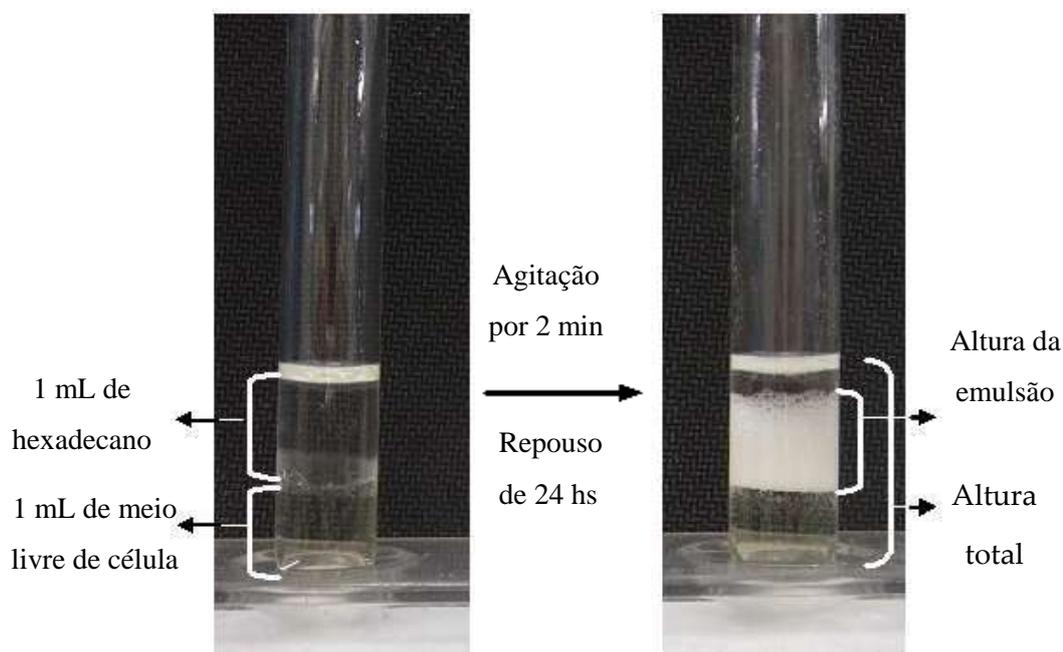


Figura 15 - Medição do IE dos meios de cultivo  
Fonte: Fontes (2008)

## 2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.6.1. QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800) a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg m.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura 16. A curva de massa seca *versus* absorvância é obtida usando-se uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45  $\mu$ m), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e então o valor de absorvância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570 nm. O fator de conversão encontrado foi 0,643.

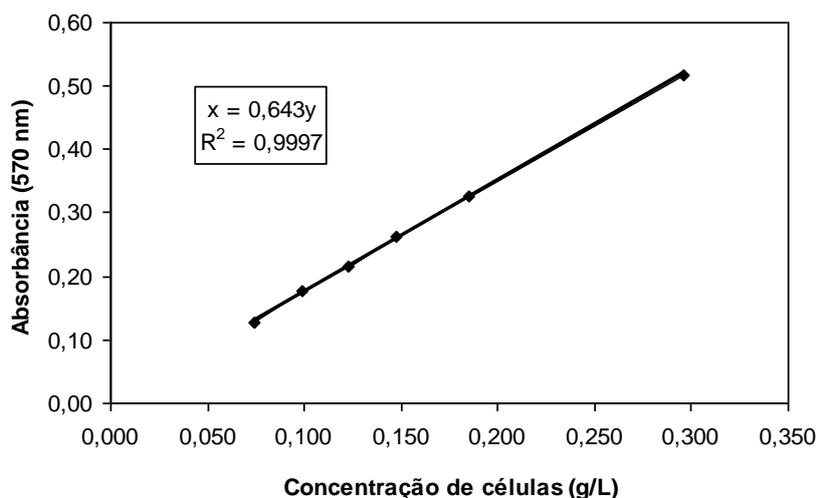


Figura 16 - Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Y. lipolytica* através de medidas de absorbância em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800).

## 2.6.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um *kit* enzimático para análise colorimétrica de glicose (*HUMAN GmbH - Germany*).

Nesse método, a absorbância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático. Tomam-se alíquotas de 15  $\mu\text{L}$  de amostra e completa-se com 1500  $\mu\text{L}$  de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 10 min a 37°C, sendo a absorbância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao *kit* enzimático possui uma concentração de 100  $\text{mg.dL}^{-1}$  e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100  $\text{mmol.L}^{-1}$ ; 4-aminofenazona 0,25  $\text{mmol.L}^{-1}$ ; Fenol 0,75  $\text{mmol.L}^{-1}$ ; Glicose oxidase 15000  $\text{U.L}^{-1}$ ; Peroxidase 1500  $\text{U.L}^{-1}$ ; Mutarotase 2000  $\text{U.L}^{-1}$ .

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da Eq. (3):

$$C = 100 \times \left( \frac{Aa}{Ap} \right) \quad (3)$$

onde:

$Aa$  = Absorbância da amostra;

$Ap$  = Absorbância do padrão;

$C$  = concentração de glicose na amostra ( $\text{mg.dL}^{-1}$ )

### 2.6.3. pH DO MEIO DE CULTIVO

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um pHmetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente (25°C).

### 2.6.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), segundo Miller (1959). A análise baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

O procedimento experimental para a determinação dos açúcares redutores consistiu em diluir as amostras, até 40 vezes. Adicionar 1 mL de DNS a 1 mL da amostra devidamente diluída em um tubo de ensaio, após a homogeneização aqueceu-se por 10 minutos em banho-maria (100°C). A seguir, as amostras foram resfriadas e adicionou-se 10 mL de água destilada, homogeneizando. Fez-se então a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão foi construída previamente utilizando soluções padrões de glicose e frutose entre 0,0 e 1,0 g.L<sup>-1</sup> (Figura 17).

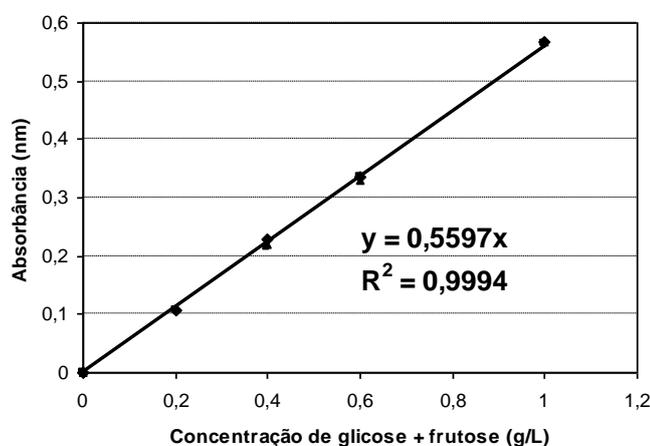


Figura 17 - Curva padrão de DNS (glicose + frutose) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo

### 2.6.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL

O glicerol foi quantificado por método enzimático-colorimétrico para quantificação de triglicerídeos (Kit LABORLAB para triglicerídeos).

A amostra do meio de cultivo foi previamente centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e diluída em até 30 vezes, com água destilada. A quantificação foi realizada a partir de 10 µL da amostra diluída e 500 µL do reativo de trabalho, o qual era composto

de: reativo enzimático (lipase 5000 U.L<sup>-1</sup>; glicerol quinase 200 U.L<sup>-1</sup>; glicerol fosfato oxidase 1500 U.L<sup>-1</sup>; peroxidase 900 U.L<sup>-1</sup>; ATP 2 mmol.L<sup>-1</sup>; 3-5 HDCBS 2 mmol.L<sup>-1</sup>; 4-aminofenazona 1 mmol.L<sup>-1</sup>) e 30 mL de reativo de tampão (50 mmol.L<sup>-1</sup> tris, pH 7,6). Após homogeneização, procedeu-se a incubação em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, seguidos de resfriamento e adição de 1 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800) a 505 nm.

Um branco foi preparado nas condições já descritas, substituindo-se o volume de amostra por água. Paralelamente a quantificação da amostra foi preparada uma curva padrão com solução de glicerol nas concentrações de 0,0 a 1,0 g.L<sup>-1</sup> ( Figura 18).

Os resultados obtidos foram calculados com base na Eq. 4, descrita a seguir e expresso em g.L<sup>-1</sup>.

$$[Glicerol] = \frac{DO_{am}}{f_c} \times f_d \quad (4)$$

onde:

DO<sub>am</sub> = Densidade óptica da amostra

f<sub>c</sub> = fator de correção

f<sub>d</sub> = fator de diluição

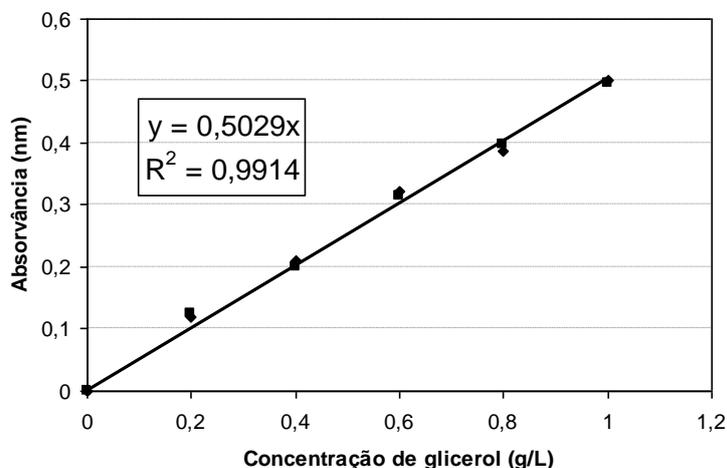


Figura 18 - Curva padrão glicerol

## 2.6.6 MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO BISSURFACTANTE

### 2.6.6.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Foi determinada através de titulação turbidimétrica (espectrofotometria). Consistia na medição da transmitância das amostras a 450 nm (ABED *et al.*, 2004), utilizando água como controle à temperatura ambiente (25°C). Diluições sucessivas

foram realizadas em triplicata na faixa de  $0,001 \text{ g.L}^{-1}$  até  $50,000 \text{ g.L}^{-1}$ , para que fosse possível prever o ponto em que a amostra passaria de turva a límpida.

Dessa forma, obtinha-se o comportamento do decaimento da transmitância em função da concentração de biossurfactante. A CMC era então obtida igualando-se as equações das duas curvas no ponto de interseção das mesmas, para uma dada faixa de concentração de biossurfactante.

#### 2.6.6.2 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO

Foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método consistia na adição de 2,5 mL de reagente do Bradford a 1 mL de água destilada contendo 1 mg de biossurfactante em tubo de ensaio à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , de forma que a concentração de amostra era de  $285,714 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O sistema era agitado, deixado em repouso por 2 minutos e, então, era feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. O valor obtido era comparado com um valor já conhecido da proteína padrão albumina de serum bovino (BSA), cuja curva padrão está ilustrada na Figura 19.

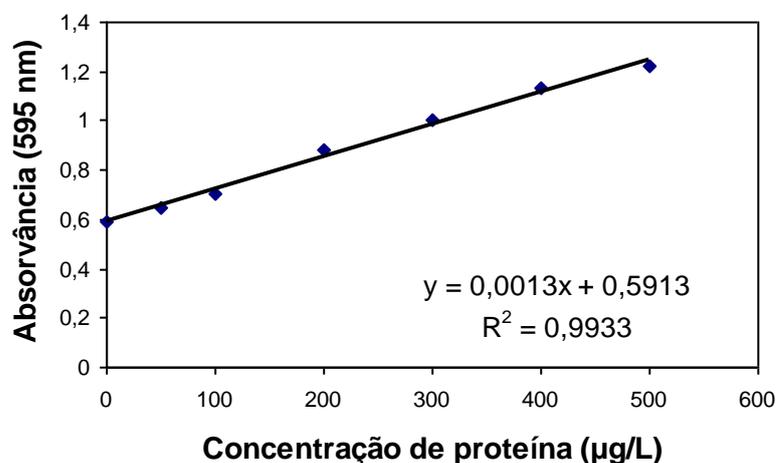


Figura 19 – Curva padrão da concentração da proteína BSA medida em espectrofotômetro.

## 2.7. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

O processamento digital de imagem foi utilizado para avaliar a estabilidade das emulsões através da distribuição do tamanho de micelas ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente (cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.7.1. PREPARO DAS EMULSÕES

Para avaliar a capacidade dos biossurfactantes produzidos a partir de ambos os meios de cultivo de estabilizar emulsões, os mecanismos de envelhecimento de emulsões óleo-em-água preparadas com os biossurfactantes foram investigados. Para tal, empregou-se um terceiro emulsificante já utilizado industrialmente, a Goma Arábica, e compararam-se os resultados de emulsões produzidas a partir dos três.

Inicialmente, os biossurfactantes foram dissolvidos em tampão acetato (pH 5) e esta solução foi misturada a n-hexadecano, na proporção de 50% (v/v) de cada um em um tubo Falcon. A combinação dos biossurfactantes, assim como a concentração utilizada nos experimentos, é baseada na CMC encontrada para cada um destes, e é apresentada na Tabela 7. As emulsões foram homogeneizadas por 3 min (12000 rpm) utilizando um Ultra-Turrax e a distribuição do tamanho de micela foi acompanhado por 45 dias utilizando análise digital de imagem.

Tabela 7 - Concentração dos biossurfactantes utilizados para cada uma das emulsões preparadas com tampão de acetato e n-hexadecano

<b>Amostra</b>	<b>Biossurfactante prod. com glicerina bruta (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Goma Arábica (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Biossurfactante prod. Com CACJ (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>I</b>	6	-	-
<b>II</b>	4,8	1,2	-
<b>III</b>	3	3	-
<b>IV</b>	-	6	-
<b>V</b>	-	-	10

### 2.7.2. ANÁLISE DE IMAGEM

O método da análise digital de imagem foi baseado no trabalho de Silva *et al.* (2010a). A evolução do tamanho de micelas da emulsão foi acompanhada ao longo de 45 dias. Na primeira semana, cada amostra foi analisada diariamente, durante cinco dias. Na segunda e na terceira semana, as análises foram realizadas duas vezes por semana e, após este período, uma vez por semana até chegar o 45º após a produção da emulsão.

A aquisição de imagens foi realizada utilizando um microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon) com ampliação de 400x, juntamente com câmera digital (Evolution VF cooled color), acoplado a um computador (Figura 20).

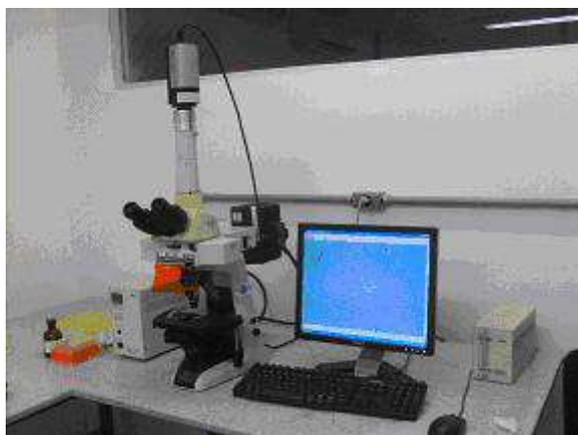


Figura 20 - Equipamento para aquisição de imagem: Microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200, acoplado a câmera de vídeo digital, Evolution VF cooled color

A análise de imagem realizada seguiu uma sequência de três etapas: binarização da imagem, quantificação de micelas e avaliação de parâmetros estatísticos. A binarização consistiu na conversão da imagem capturada para preto e branco e na remoção de ruído.

A sequência das operações executadas pode ser dividida em quatro partes primordiais (WILKINSON, 1998):

1. Criação de uma imagem binária a partir de uma imagem intensa com base num limiar de luminância;
2. Utilização de uma mediana de filtragem para remover o ruído;
3. Supressão das estruturas ligadas à borda da imagem;
4. Erosão da imagem binária e reconstrução morfológica usando uma máscara previamente criada.

Esta sequência de etapas pode ser melhor compreendida a partir da visualização da Figura 21.

Imagem Original

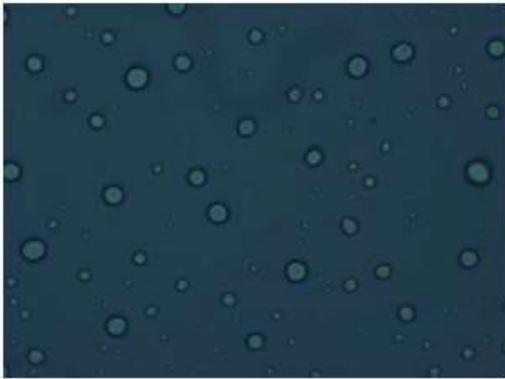


Imagem em tons de Cinza

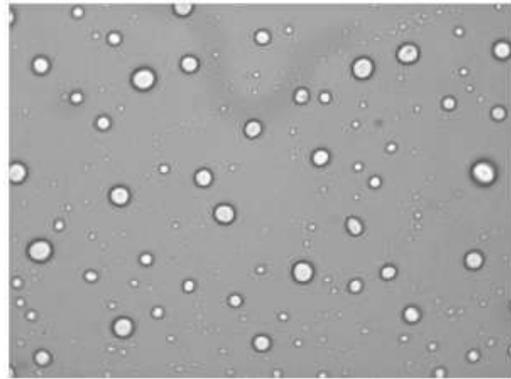
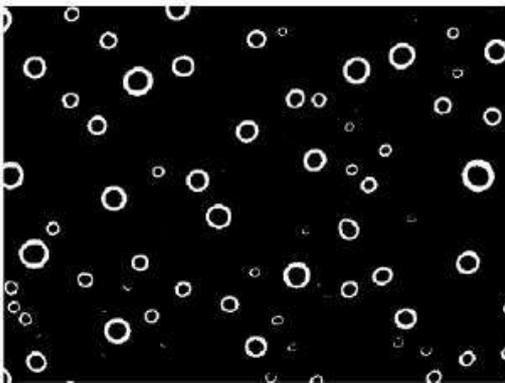
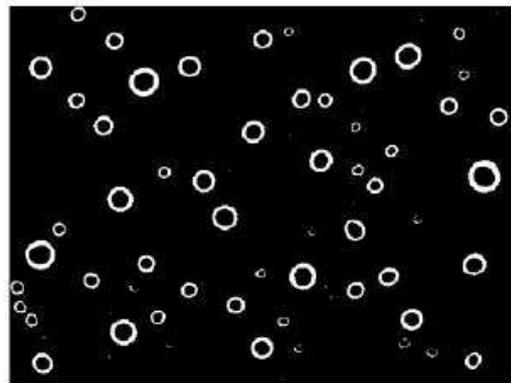


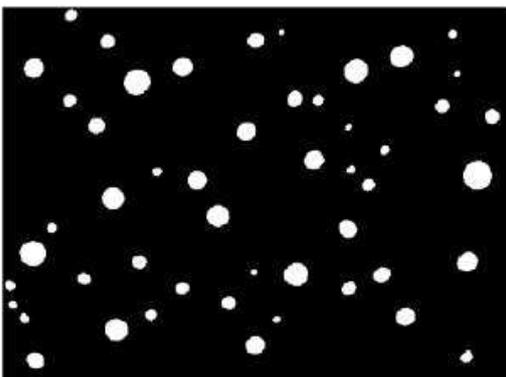
Imagem Binarizada



Eliminação de Bordas



Preenchimento das micelas e erosão



Reconstrução

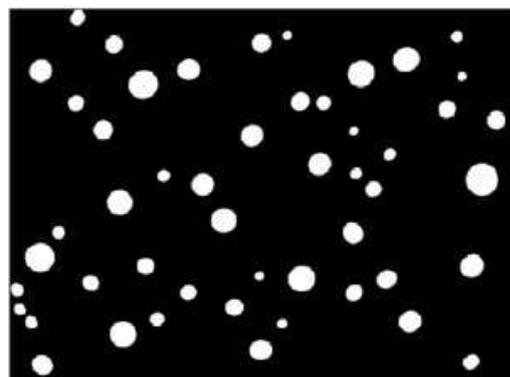


Figura 21 - Tratamento das imagens obtidas por microscopia  
Fonte: Garcia (2008)

Esta primeira etapa é a parte vital do processo de análise de imagem, pois contém todos os dados mensuráveis necessários para a quantificação. A segunda etapa quantifica as micelas na imagem, obtendo-se os parâmetros como: diâmetro, volume e área de micelas (SILVA *et al.*, 2010a).

Cada imagem foi analisada e o tamanho das micelas foi quantificado com um programa de análise de imagem desenvolvido em Matlab ® 7.1 para esta finalidade. Um software de micrômetro apropriado, Image-Pro Plus 5.0 ®, foi utilizado para a calibração do tamanho da micela. Mais detalhes sobre este procedimento podem ser encontrados em outras referências (FREIRE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2008). A cada ponto, era obtida uma média de 100 micelas por imagem e cerca de 40 imagens diferentes de cada amostra foram analisadas, proporcionando uma média total de 4000 micelas por cada ponto. O passo de quantificação de análise de imagem (FREIRE *et al.*, 2005) fornece uma análise estatística dos dados que quantificam o número total de objetos analisados, o diâmetro médio das micelas e o seu desvio padrão, bem como a distribuição do tamanho de partícula. Ele também fornece a circularidade de partículas e sua distribuição, útil para detectar se outros objetos além das micelas estão sendo analisados.

# CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Para acompanhar a produção do biossurfactante a partir do meio de cultivo contendo glicerina bruta, realizou-se um estudo sobre o crescimento das células junto ao consumo de substrato e da tensão superficial junta ao índice de emulsificação em função do tempo.

O perfil cinético de crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio de cultivo contendo glicerol bruto e o consumo desse substrato pela levedura estão ilustrados na Figura 20. Pode-se observar um crescimento exponencial até o tempo de 72 h, onde o mesmo passa a ser constante, indicando que, com este tempo de experimento, as células haviam alcançado a fase estacionária de crescimento. A concentração celular final obtida foi de 12,03 g.L<sup>-1</sup>. A Figura 22 também ilustra que o glicerol bruto foi praticamente todo consumido até o final do experimento, indicando que este serviu como substrato para a levedura.

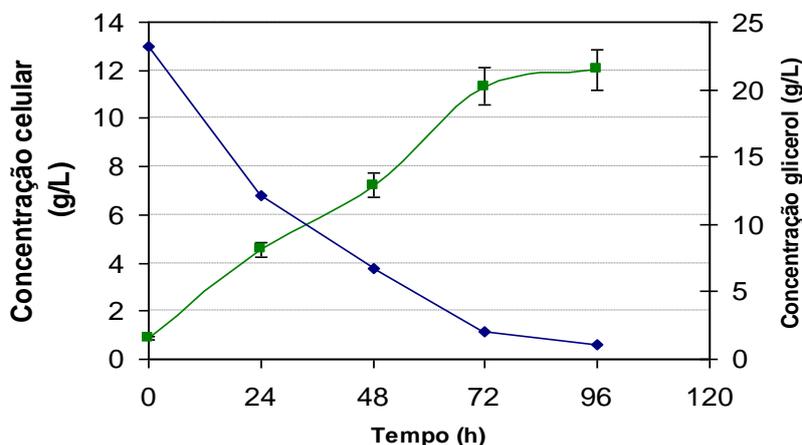


Figura 22 - Perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* (■) e de consumo do glicerol (◆) em meio contendo glicerina bruta (3%)

Machado Junior (2010), ao produzir células de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cultivada em meio à base de glicerina residual à temperatura de 25°C, atingiu uma concentração de biomassa de 17,7 g.L<sup>-1</sup>, valor ligeiramente superior ao encontrado neste trabalho.

Os comportamentos do índice de emulsificação (IE) e da variação da tensão superficial ( $\Delta T$ ) do meio de cultivo à medida que o biossurfactante era produzido pela levedura também foram analisados (Figura 23). Pode-se observar que o IE teve o seu valor máximo de 70,22% ao final dos experimentos, apresentando um aumento significativo entre 0 e 24 horas, indicando que já no primeiro dia de cultivo o biossurfactante começou a ser produzido pela levedura e excretado para o meio de cultivo. Nota-se também que a tensão superficial apresentou um decaimento praticamente linear durante todos os 5 dias de experimento, resultando numa diminuição total de 22 mN/m.

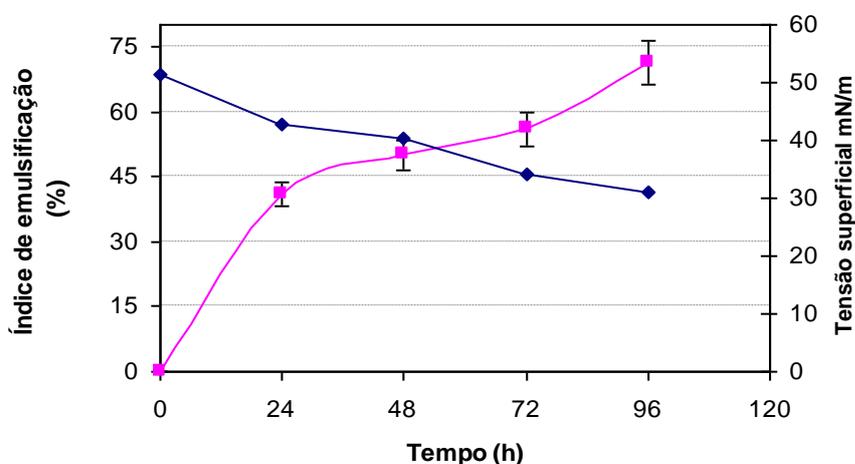


Figura 23 - Evolução do índice de emulsificação (■) e da tensão superficial (◆) durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina.

Sousa *et al.* (2007) estudaram a produção de biossurfactante pela bactéria *P. aeruginosa* utilizando como fonte de carbono a fase glicerínica (6%) obtida do processo de produção do biodiesel e  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio. Os autores obtiveram IE de 64% frente ao hexadecano e uma redução da tensão superficial da água de 45,7%. Valores maiores de IE foram obtidos no presente trabalho com *Y. lipolytica*, atingindo 70,22% com a glicerina bruta, sendo que a redução da tensão superficial foi aproximadamente igual ao valor obtido pelos mesmos autores.

Ciapina *et al.* (2007) avaliaram a utilização de glicerol puro como fonte de carbono para produção de biossurfactante pela bactéria *Rhodococcus erythropolis*. Após 51 horas de cultivo,  $1,7 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa foram obtidos, o biossurfactante produzido apresentou um índice de emulsificação de 67% e valores da tensão superficial e interfacial de 43 e 15 mN/m, respectivamente.

Já para o meio de cultivo contendo CACJ, o consumo de açúcares totais do substrato pelas células se deu de forma mais rápida, chegando à zero em apenas 48 h. A concentração de *Y. lipolytica* obtida ao fim do experimento foi um pouco menor do que aquela obtida com o meio de cultivo contendo glicerol bruto, totalizando  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ , como é possível se observar na Figura 24.

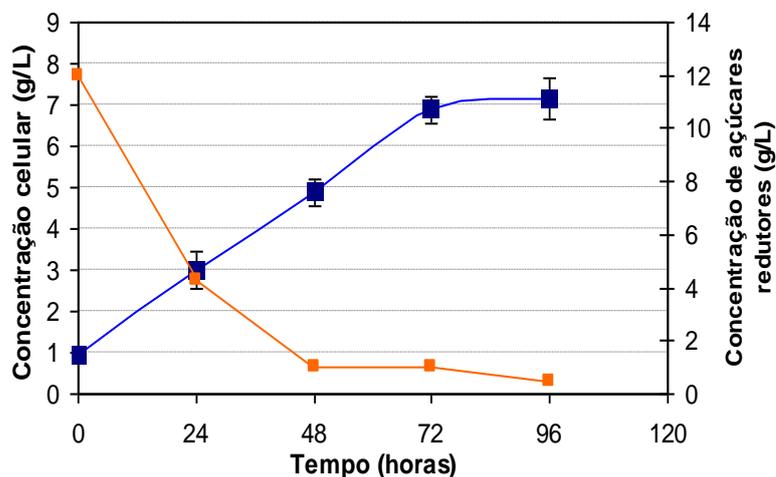


Figura 24 - Perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* (■) e consumo de açúcares totais (■) em meio contendo suco de caju diluído de 1:10

Analisando a Figura 24, nota-se que, em 48 horas de fermentação, as células ainda estavam na fase exponencial de crescimento, entrando na fase estacionária apenas após 72 horas de fermentação. Rocha (2007) e Souza *et al.* (2005) ao avaliarem o suco de caju como substrato para o cultivo submerso de *Pseudomonas aeruginosa*, observaram que as células da bactéria cultivada entraram na fase estacionária com 30 e 25 horas de fermentação, respectivamente, tempo inferior ao das células de *Y. lipolytica*.

A Figura 25 ilustra a evolução do índice de emulsificação e da tensão superficial no meio de cultivo contendo CACJ em função do tempo de experimento. Em relação à tensão superficial, pode-se observar na Figura 25 que esta apresentou um comportamento não muito distinto dos experimentos conduzidos a partir da glicerina bruta, apresentando um decaimento linear até 48 h e, após isso, passando a ser constante, sendo a sua variação total de 23,44 mN/m. Já o IE para o meio contendo CACJ apresentou um comportamento distinto do anterior, aumentando mais entre os tempos de 24 e 48 h do que nas 24 primeiras horas (como foi observado para o meio de cultivo contendo glicerol bruto), decrescendo entre 48 e 72 h e tornando a subir novamente entre 72 e 96 h. Esse comportamento pode ser explicado pela maior

formação de espuma nos experimentos contendo CACJ, o que pode ter ocasionado a passagem do biossurfactante para a mesma. Entre 72 e 96 h, a produção de biossurfactante total volta a aumentar e, com isto, a quantidade de biossurfactante na fase aquosa iguala-se àquela do tempo de 48 h, mesmo estando uma fração deste ainda na espuma. O IE obtido ao fim do experimento foi de 65%.

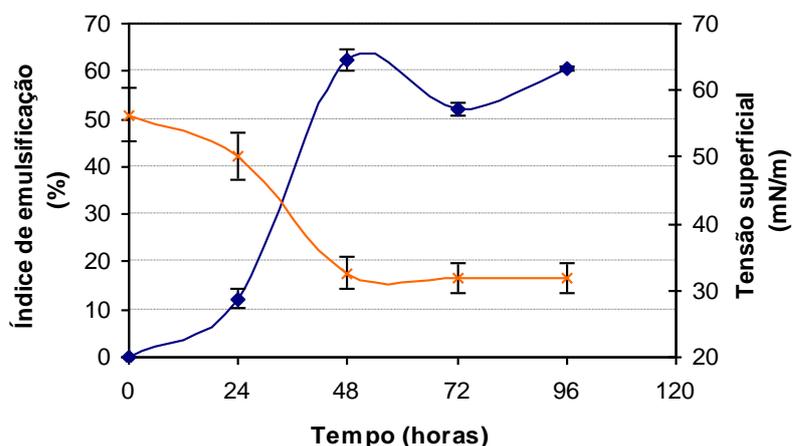


Figura 25 - Evolução do índice de emulsificação (♦) e da tensão superficial (x) durante a produção de biossurfactante em meio contendo suco de caju

Fontes (2008), ao produzir biossurfactante em CACJ, observou o mesmo fenômeno da Figura 25, identificando-o como um “vale”, ou seja, uma diminuição do IE de emulsificação em 48 h de fermentação. A autora constatou que este comportamento pode ser atribuído à presença de proteases produzidas pela levedura que, segundo Grangemard *et al.* (1999), atuam sobre a porção peptídica do surfactante, gerando um lipopeptídeo de cadeia aberta e diminuindo, desta forma, a eficiência destes. Outra possibilidade é que a levedura durante este período utilize o biossurfactante formado como fonte de carbono. Amaral (2007) também observou este fenômeno ao estudar pela primeira vez a produção do Yansan por *Y. lipolytica*.

A produção de biossurfactante pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, utilizando suco de caju natural e um meio mineral complexo foi avaliado por Rocha *et al.* (2006). Os autores observaram que o valor máximo alcançado do IE foi 58,8%, valor inferior ao obtido neste trabalho. No mesmo trabalho, não houve uma diminuição significativa da tensão superficial do meio durante os ensaios, passando esta de 70 para 63 mN/m. Contrariamente ao observado neste trabalho, a produção de biossurfactante ocorreu apenas durante a fase estacionária, tendo um comportamento típico de um metabólito secundário.

Segundo Willumsen e Karlson (1996), um biossurfactante com boas propriedades emulsificantes apresenta um IE acima de 50%, como é o caso de ambos os biossurfactantes produzidos no presente trabalho (70,22% e 65,00%). Segundo Cooper e Paddock (1984), um organismo é considerado promissor produtor de biossurfactante quando produz compostos tensoativos com tensão superficial inferior a 40 mN/m, como também é o caso da levedura *Y. lipolytica* na produção ambos os surfactantes estudados neste trabalho.

A partir destes resultados iniciais, pôde-se concluir que os meios de cultivos escolhidos eram adequados tanto para o crescimento celular de *Y. lipolytica* quanto para a produção de biossurfactante. A Tabela 8 resume estes primeiros resultados, revelando os parâmetros avaliados para cada um dos dois meios de cultivo produzidos.

Tabela 8 - Parâmetros obtidos na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando CACJ e glicerol bruto como fonte de carbono

<b>Parâmetro</b>	<b>CACJ (diluído 1:10)</b>	<b>Glicerol bruto</b>
$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,08	0,12
$-\text{dS}/\text{dt}$ ( $\text{g} \cdot (\text{l} \cdot \text{h})^{-1}$ )	0,22	0,21
$\Delta\text{TS}$ ( $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ )	24,33	22,00
IE (%)	65,00	70,22
$X_f$ ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	7,15	12,03

$\mu$ : taxa específica de crescimento  
 $-\text{dS}/\text{dt}$ : taxa de consumo de açúcar  
 $\Delta\text{TS}$ : variação da tensão superficial  
 IE: índice de emulsificação  
 $X_f$ : concentração celular final

## 3.2. PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

### 3.2.1. PURIFICAÇÃO A PARTIR DO MEIO DE CULTIVO CONTENDO GLICEROL BRUTO

A purificação de biossurfactantes a partir do meio de cultivo obtido do processo fermentativo é um dos fatores determinantes do alto custo de sua produção. Nesta etapa do trabalho, a habilidade de solventes em isolar o biossurfactante produzido por *Y. lipolytica* foi avaliada utilizando diferentes sistemas de extração para ambos os meios de cultivo produzidos.

Inicialmente, foram utilizadas as mesmas proporções de Amaral (2007) para a extração com clorofórmio e metanol (1:4:4) e de Farias e Sarrubo (2006) para a acetona (1:1) e para o acetato de etila (1:1). Porém, como não houve significativa formação de precipitado em nenhuma das extrações iniciais, as proporções dos solventes foram modificadas até que se observasse a formação de um precipitado branco na interface das duas fases imiscíveis ou no fundo do funil, apenas para o sistema clorofórmio/metanol, pois os outros dois solventes não apresentaram formação de precipitado, apenas a formação de uma terceira fase. Os resultados das extrações realizadas com os 3 sistemas de solventes estão expostos na Figura 26.

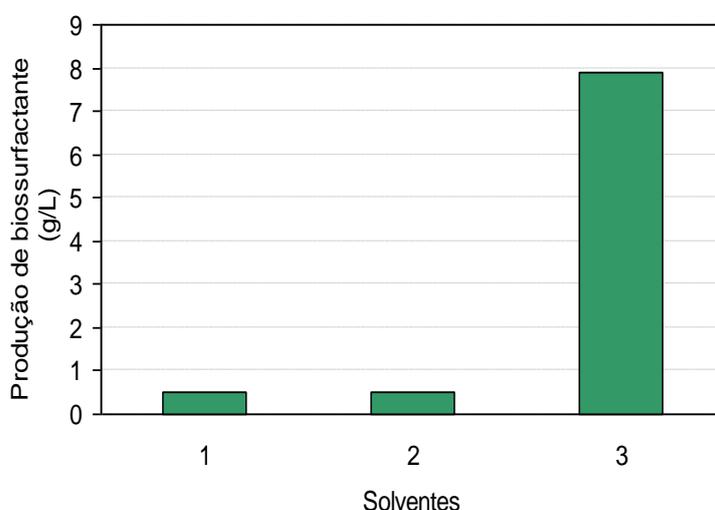


Figura 26 - Produção da extração do biossurfactante utilizando como solventes: acetona (1), acetato de etila (2) e clorofórmio/metanol (3)

Conforme ilustra a Figura 26, a melhor produção de biossurfactante foi obtida quando se utilizou a proporção 1:8:8 de extrato concentrado/clorofórmio/metanol. A partir deste resultado inicial, foram realizados outros testes com este mesmo sistema de solventes, visando otimizar a produção de biossurfactante.

A Figura 27 mostra os resultados obtidos das diferentes extrações realizadas com as proporções de concentrado/clorofórmio/metanol variando de 1:1:1 até 1:8:8. Observa-se na Figura 27 que não houve aumento na produção de biossurfactante com a diminuição da quantidade de solventes. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se a proporção de 1:8:8, no qual foi encontrada a concentração de  $7,92 \text{ g.L}^{-1}$  de biossurfactante por litro de meio de cultivo utilizando glicerol bruto como substrato.

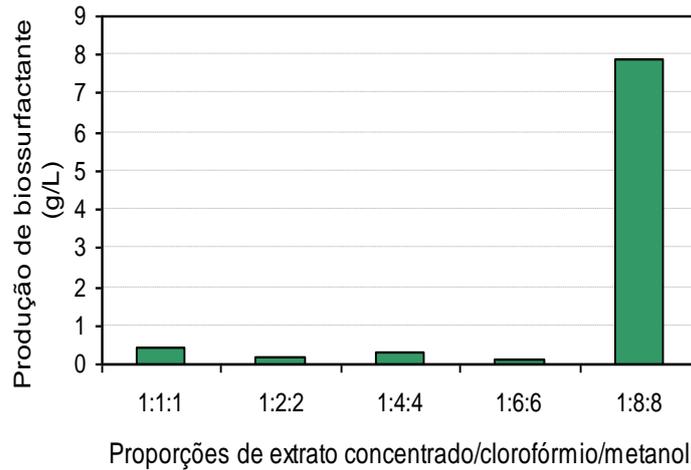


Figura 27 - Produção de biossurfactante a partir de diferentes proporções de extrato concentrado/clorofórmio/metanol

A Figura 28 mostra a fotografia do processo de extração, onde foi obtida a máxima produção de biossurfactante. Pode-se observar claramente a formação de um precipitado branco no fundo do funil de separação, contendo o biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta.



Figura 28 – Fotografia do processo de extração do biossurfactante. Funil de separação contendo: extrato concentrado/clorofórmio/metanol, na proporção de 1:8:8, com formação de precipitado branco no fundo.

### 3.2.2. PURIFICAÇÃO A PARTIR DO MEIO DE CULTIVO CONTENDO CACJ

Após a escolha do melhor sistema de solventes para o primeiro experimento, foi realizada a extração do biossurfactante produzido pela *Y. lipolytica* utilizando CACJ como fonte de carbono. A Figura 29 mostra os diferentes sistemas de solventes utilizados para extração do biossurfactante. Pode-se observar que o sistema clorofórmio/metanol também apresentou o melhor resultado, apresentando uma produção de 6,85 g de biossurfactante por 1000 mL de meio de cultivo contendo CACJ.

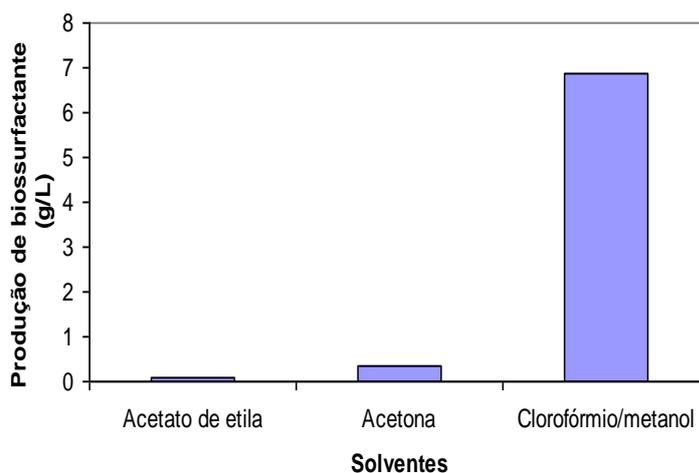


Figura 29 - Produção de extração do biossurfactante produzido a partir do CACJ utilizando como solventes: acetato de etila, acetona e clorofórmio/metanol

Vidal *et al.* (2010) avaliaram a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando o glicerol puro (PA) como fonte de carbono, obtendo uma produção de 1,09 g.L<sup>-1</sup> de biossurfactante quando extraído com clorofórmio/metanol.

Farias e Sarrubo (2006), ao pesquisarem sobre a produção de biossurfactante a partir de *Candida lipolytica* utilizando óleo de canola e glicose como substratos, encontraram maior produção com acetato de etila (8 g.L<sup>-1</sup>) em proporção 1:1.

Sobrinho (2007) estudou a produção de biossurfactante a partir da levedura *Candida sphaerica*, utilizando meio de cultivo contendo 5,0% do resíduo de refinaria de óleo de soja e 2,5% de milhocina. Após 144 horas de cultivo, foi encontrada a concentração de 4,5 g.L<sup>-1</sup> do biossurfactante isolado.

Rufino (2006) pesquisou a utilização da levedura *Candida lipolytica* para a produção de biossurfactante a partir de meio de cultivo contendo resíduo industrial (6%) e ácido glutâmico (1%). A produção do biossurfactante obtido foi avaliada durante 72 horas a 150 rpm e 28°C, e a produção foi de 4,5 g.L<sup>-1</sup> de biossurfactante.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

#### 3.3.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração média de proteína encontrada no biossurfactante produzido a partir de meio de cultivo contendo glicerina bruta, com seu respectivo desvio padrão, é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de proteínas do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta

<b>Leitura</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Concentração de PTN (g/L)</b>
Média	0,6397	37,2564
Desvio Padrão	0,0060	4,5770

Pode-se observar na Tabela 9 que a concentração de proteínas encontrada foi de  $37,2564 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondente a 13,04% da concentração de amostra total ( $285,714 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Os resultados encontrados para o biossurfactante produzido a partir de meio de cultivo contendo CACJ estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração de proteínas do biossurfactante produzido a partir de CACJ

<b>Leitura</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Concentração de PTN (g/L)</b>
Média	0,6260	26,7179
Desvio Padrão	0,0025	1,9526

Nota-se na Tabela 10 que a concentração protéica encontrada para o biossurfactante produzido com o meio contendo CACJ foi de  $26,7179 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondente a 9,35% do biossurfactante.

Amaral *et al.* (2006), ao analisarem o teor de proteínas do Yansan, produzido a partir de glicerol PA, encontrou 15%, valor próximo ao encontrado para o biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta.

### 3.2.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A CMC é um parâmetro crucial quando se trata da caracterização de biossurfactantes, pois indica qual é a concentração mínima necessária de biossurfactante em solução para que ocorra um abaixamento máximo de tensão superficial e interfacial, ou seja, quanto menor a CMC, mais eficiente é o biossurfactante (MEIRA, 2007).

A Figura 30 ilustra o decaimento da transmitância em função da concentração do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta. A CMC foi obtida a partir do ponto de interseção das duas curvas, cujo melhor ajuste foi em  $1,77 \text{ g.L}^{-1}$ .

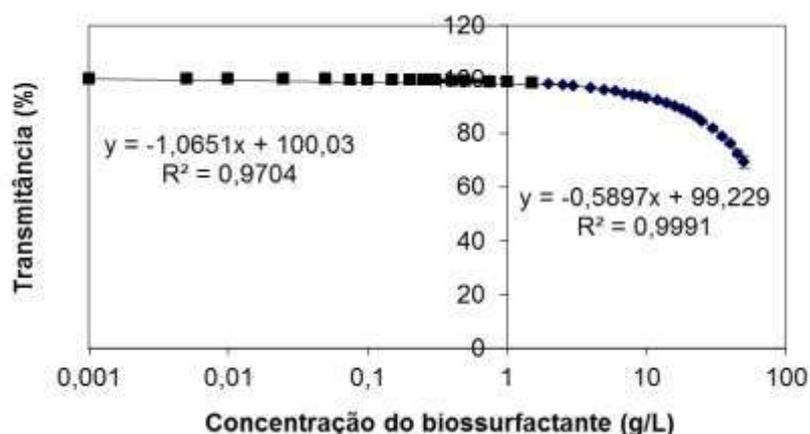


Figura 30 – Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta antes (■) e depois (◆) da interseção das curvas

A Figura 31 ilustra o decaimento da transmitância em função da concentração do biossurfactante produzido com o CACJ.

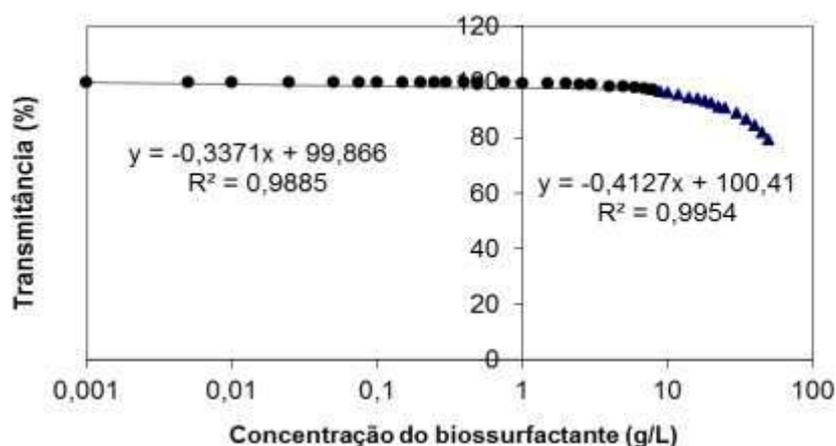


Figura 31 - Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido com o CACJ antes (●) e depois (▲) da interseção das curvas

A CMC média encontrada para o biossurfactante produzido a partir do CACJ foi de 7,85 g.L<sup>-1</sup>, valor relativamente menor do que o encontrado para o biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta, o que significa que este apresenta maior poder tensoativo.

A Tabela 11 apresenta alguns surfactantes naturais e sintéticos e suas respectivas CMCs. Pode-se observar que a CMC do biossurfactante produzido pela *Y. lipolytica* utilizando glicerina bruta como fonte de carbono apresentou valor de CMC próximo ao surfactante natural Goma Arábica, enquanto o biossurfactante produzido a partir de CACJ apresentou uma CMC elevada em relação aos demais.

Tabela 11 – Exemplos de emulsificantes e suas respectivas CMCs

Surfactante	CMC (g/L)	Referência
Produzido por <i>Y. lipolytica</i> utilizando glicerina bruta como fonte de carbono	1,77	Presente trabalho
Produzido por <i>Y. lipolytica</i> utilizando suco de caju como fonte de carbono	7,85	Presente trabalho
SDS (Dodecil sulfato de sódio)	2,10	Kile e Chlou (1989)
CTAB (cetyltrimethylammonium bromide )	0,36	Kile e Chlou (1989)
Goma Arábica	1,65	Amaral <i>et al.</i> (2006)
Yansan	0,50	Amaral <i>et al</i> (2006)
Goma Xantana	0,30	Amaral <i>et al</i> (2006)
Triton X-405 (TX405)	0,62	Kile e Chlou (1989)

### 3.4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES

Os mecanismos de envelhecimento de emulsões foram estudados através do acompanhamento do tamanho diâmetro médio de micelas utilizando análise digital de imagem. A partir de um teste inicial, concluiu-se que não era necessário realizar a diluição das amostras. Um exemplo de uma fotografia tirada de uma emulsão produzida com o biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta é ilustrado na Figura 32.

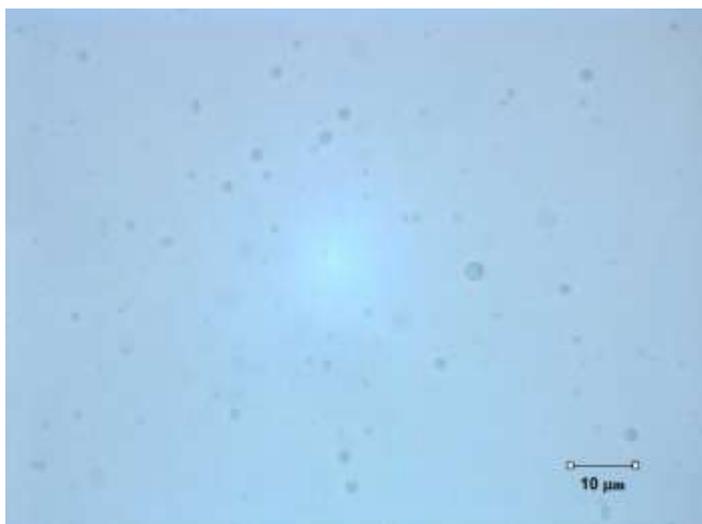


Figura 32 - Exemplo de fotografia óptica tirada das emulsões formadas.

Durante os 45 dias de armazenamento, as emulsões foram visualmente estáveis, apesar de terem sofrido uma ligeira separação de fases na primeira hora após a sua produção. De fato, os resultados obtidos através do processamento de imagem mostraram que as amostras se mantiveram estáveis. A Tabela 12 apresenta a largura e o pico das micelas no primeiro dia (1º Dia) e no último dia de análise de estabilidade (45º Dia). Os picos compreendem os diâmetros médios das micelas, que foram normalizados (ajustados entre 0 e 1) com o seu tamanho máximo e eram praticamente constantes com o tempo, variando entre 0,38 e 0,43, o que mostra que as micelas formadas não apresentaram diâmetros muito elevados. A maior variação de tamanho do diâmetro médio foi obtida com a emulsão II, que continha somente Goma Arábica (0,34-0,42), mostrando-se ser a mais heterogênea. A razão de pico da emulsão I, preparada com o biossurfactante produzido a partir de glicerina bruta, foi a menor de todas (1,06), o que indica que estas micelas apresentaram o menor crescimento, permanecendo mais estáveis do que as outras. A emulsão V, preparada apenas com o biossurfactante produzido a partir do CACJ, perdeu completamente a sua estabilidade após uma hora de preparo e, portanto, a mesma não foi analisada, pois não é interessante industrialmente se utilizar quantidades tão elevadas de biossurfactante para a produção de emulsão.

Tabela 12 - Amplitudes e picos das Gaussianas do primeiro e do último dia de análise de estabilidade

Emulsão	Amplitude		Pico	
	1º Dia	45º Dia	1º Dia	45º Dia
I	0,10	0,15	0,37	0,40
II	0,08	0,18	0,36	0,43
III	0,14	0,20	0,38	0,43
IV	0,14	0,23	0,34	0,42

Composições das emulsões:

I - 6 g.L<sup>-1</sup> do biossurfactante produzido com glicerina bruta

II - 4,8 g.L<sup>-1</sup> do biossurfactante produzido com glicerina bruta e 1,2 g.L<sup>-1</sup> de Goma Arábica

III - 3 g.L<sup>-1</sup> do biossurfactante produzido com glicerina bruta e 3 g.L<sup>-1</sup> de Goma Arábica

IV - 6 g.L<sup>-1</sup> do emulsificante Goma Arábica

A análise estatística dos dados experimentais, com o objetivo de assegurar que não há erros sistemáticos presentes nas medições do diâmetro da partícula, foi realizada para todas as amostras. Entre outros aspectos, é importante assegurar que o processo de análise de imagem é capaz de detectar as menores micelas e que as amostras são analisadas de forma aleatória, sem detecção de micelas de tamanho preferencial. Quando não estão presentes erros sistemáticos, a população de tamanho de micela deve seguir uma distribuição Gaussiana (TRINDADE *et al.*, 2008).

Comprovando que erros sistemáticos não estiveram presentes nos resultados, a distribuição do tamanho das micelas das amostras apresentou um comportamento do tipo gaussiano, como evidenciado nas Figuras 33 a 36. Embora variações significativas no diâmetro médio das micelas não tenham sido observadas dentro do período de armazenamento, a distribuição do tamanho das micelas apresentou menor uniformidade (maior heterogeneidade) no último dia da análise (45 ° dia).

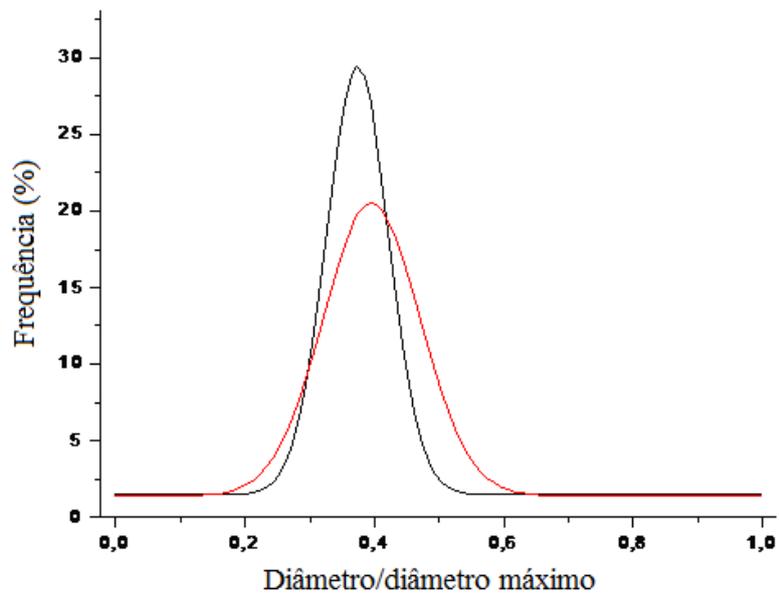


Figura 33 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão I, contendo apenas o biossurfactante produzido ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ) a partir de glicerina bruta. \_\_\_ 1º Dia \_\_ Último dia (45º Dia)

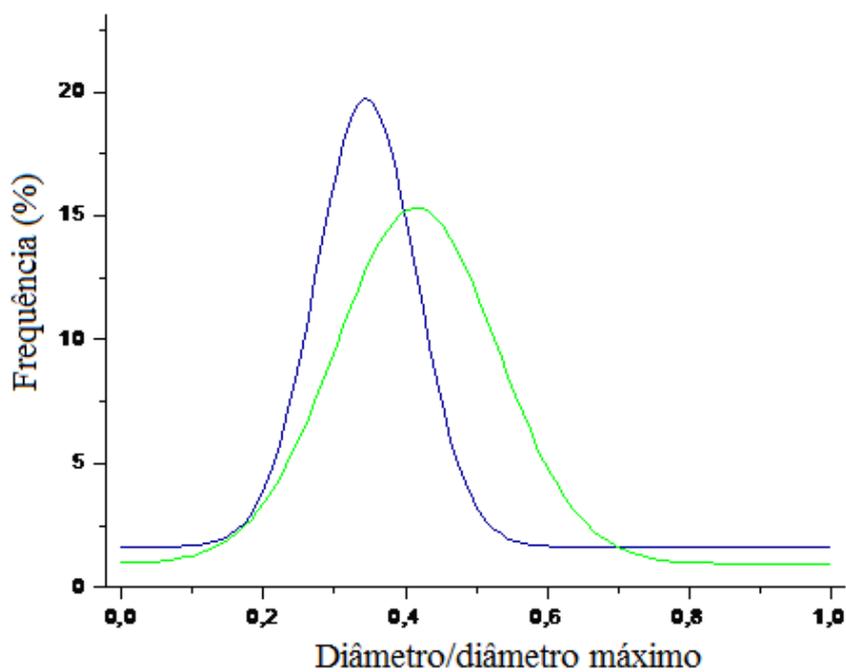


Figura 34 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão II, contendo o biossurfactante ( $4,8 \text{ g.L}^{-1}$ ) produzido a partir de glicerina bruta e goma arábica ( $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). \_\_\_ 1º Dia  
Último dia (45º Dia)

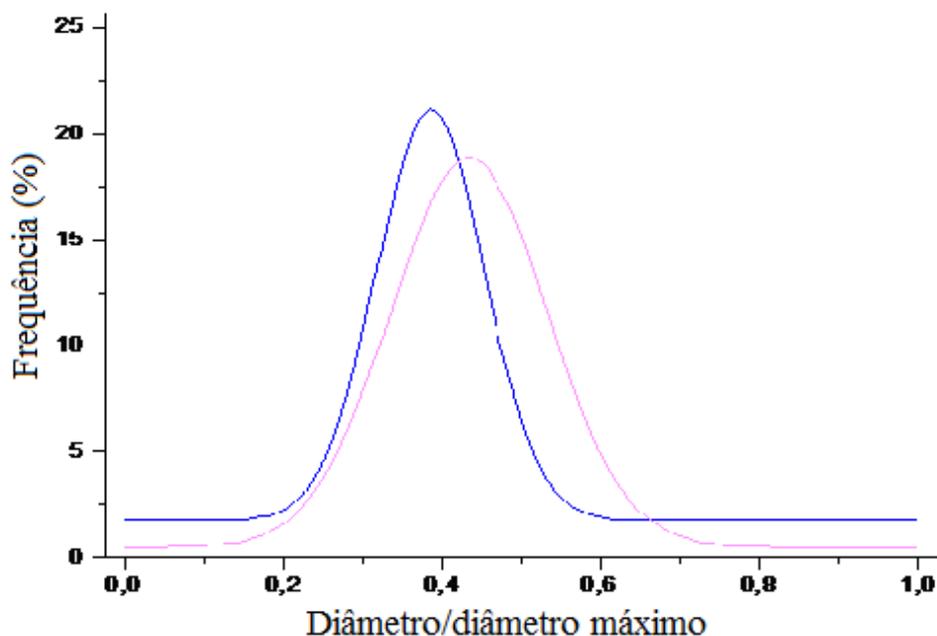


Figura 35 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão III, contendo  $3 \text{ g.L}^{-1}$  do biossurfactante produzido com glicerina bruta e  $3 \text{ g.L}^{-1}$  de Goma Arábica. — 1º Dia — Último dia (45º Dia)

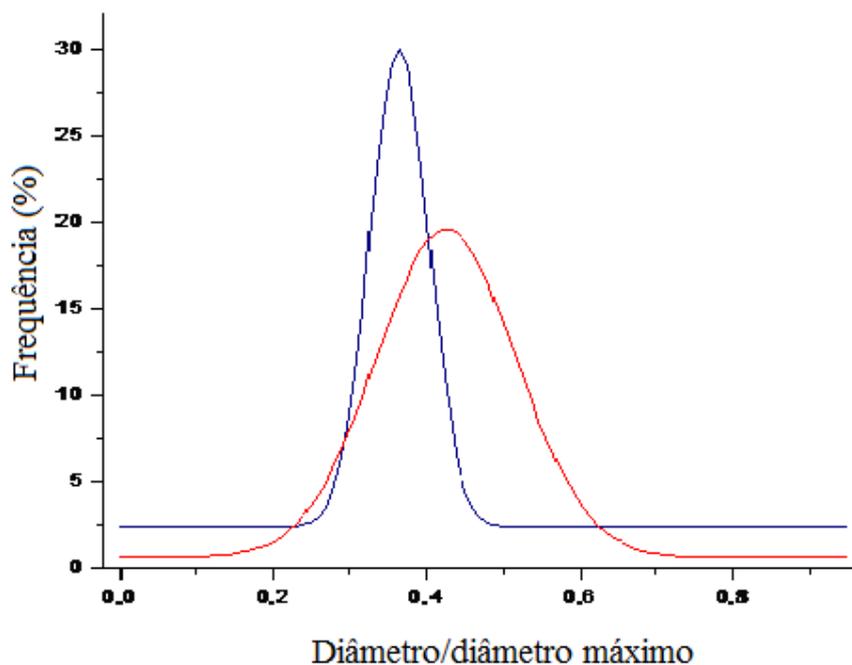


Figura 36 - Evolução do tamanho de micelas em função do tempo para a emulsão IV, contendo apenas o emulsificante Goma Arábica ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ). — 1º Dia — Último dia (45º Dia)

Os resultados obtidos para a distribuição de tamanho de micelas mostraram que todas as emulsões podem ser caracterizadas como heterogêneas, como mostra a Tabela 12 e as Figuras 33 a 36. A amplitude de distribuição do último dia é maior do que a observada no primeiro dia, o que significa que as amostras se tornaram mais

heterogêneas ao longo do tempo. As emulsões mais heterogeneas foram obtidas utilizando uma maior percentagem de Goma Arábica (emulsão IV), o que indica que este composto produz emulsões com menor estabilidade do que os gerados pela emulsão I, formulada com o biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta.

O diâmetro médio das micelas também foi avaliado em relação ao tempo para as 4 emulsões produzidas. As Figuras 37 a 40 ilustram o comportamento do diâmetro médio ao cubo em função do tempo para as 4 emulsões produzidas.

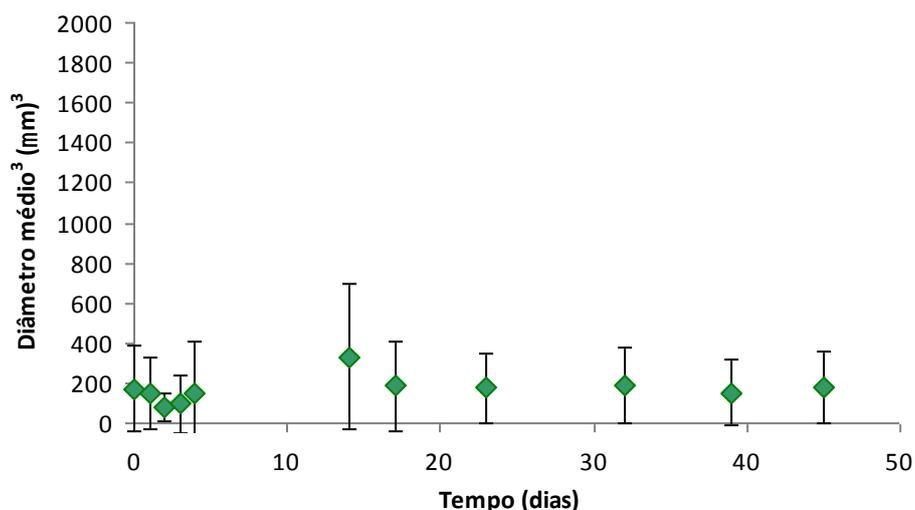


Figura 37 – Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão I, contendo  $6 \text{ g.L}^{-1}$  do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta

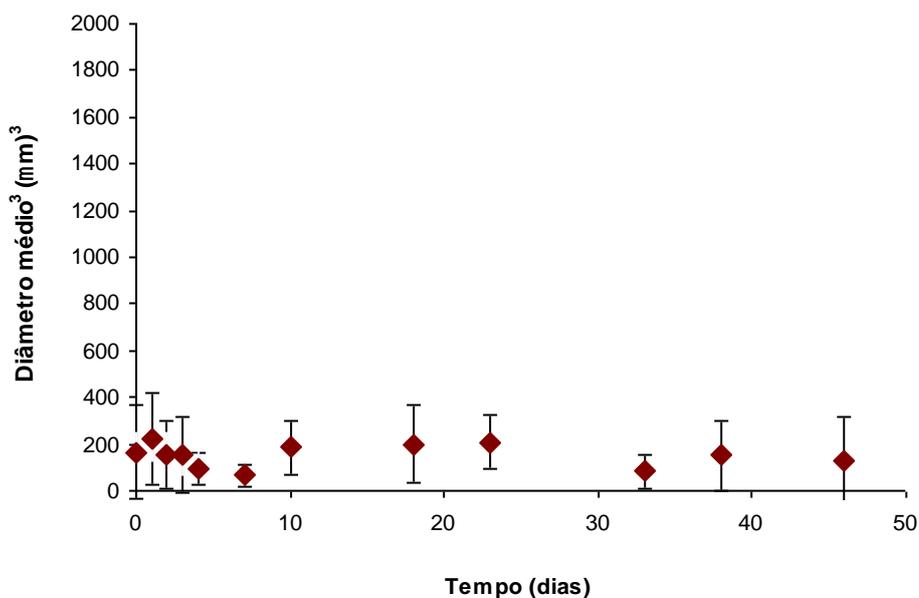


Figura 38 - Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão II, contendo  $4,2 \text{ g.L}^{-1}$  do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta e  $1,8 \text{ g.L}^{-1}$  de Goma Arábica

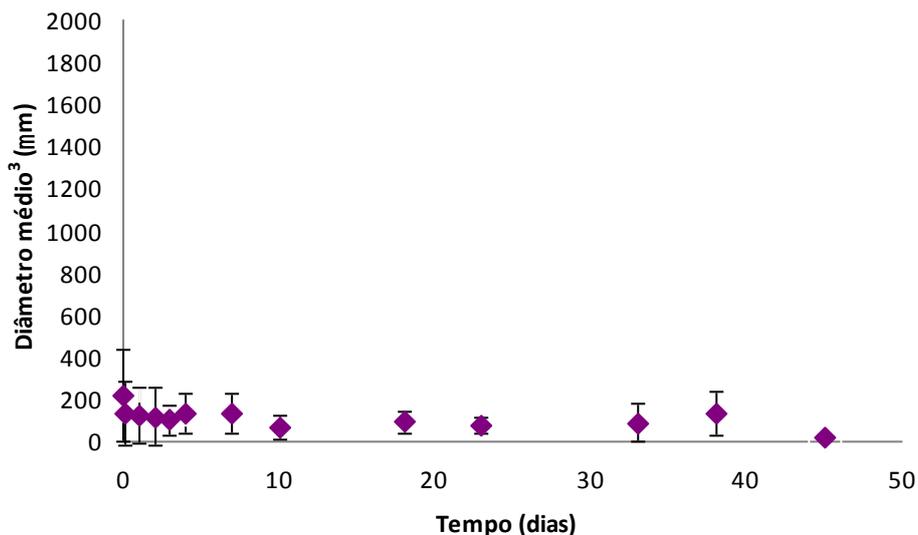


Figura 39 - Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão III, contendo  $3 \text{ g.L}^{-1}$  do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta e  $3 \text{ g.L}^{-1}$  de Goma Arábica

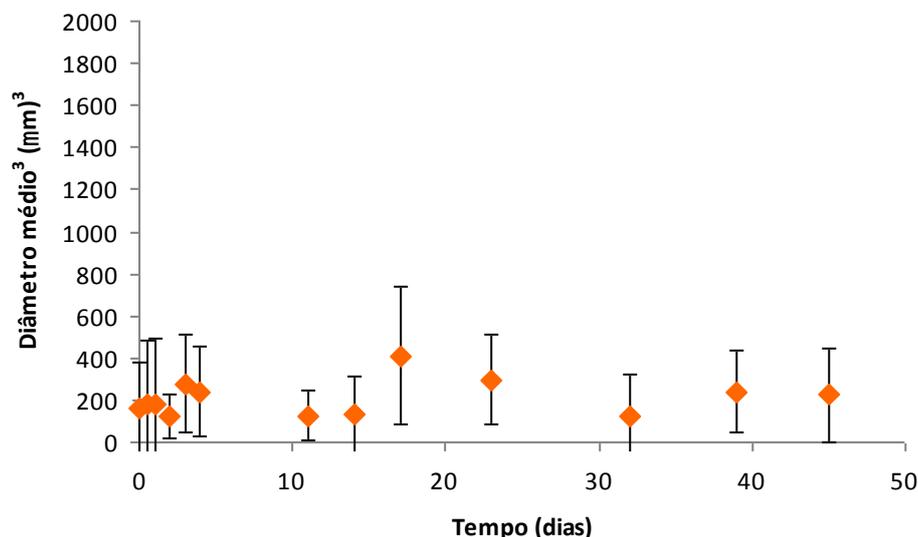


Figura 40 - Evolução do diâmetro médio ao cubo das micelas em relação ao tempo para emulsão IV, contendo  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de Goma Arábica

De acordo com as Figuras 37 a 40, todas as emulsões produzidas permaneceram praticamente estáveis ao fim dos 45 dias de análise. Como não houve perda de estabilidade ao longo dos 45 dias, não foi possível inferir um mecanismo de envelhecimento para as emulsões.

Trindade *et al.* (2008) avaliaram os mecanismos de envelhecimento de emulsões óleo-em-água preparadas com Goma Arábica e Yansan em temperatura ambiente. Os autores mostraram que as emulsões contendo Yansan desestabilizaram por coalescência.

# CONCLUSÕES

---

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

✓ Tanto a glicerina bruta proveniente da produção do biodiesel quanto o rejeito agroindustrial do suco de caju são matérias-primas adequadas à produção de biossurfactante a partir da levedura *Y. lipolytica*. Com a utilização da glicerina bruta, foi atingido IE de 70,22% e  $\Delta$ T<sub>S</sub> de 22 mN/m e com a utilização de CACJ foi atingido IE de 65% e  $\Delta$ T<sub>S</sub> de 23,44 mN/m.

✓ Dentre os 3 sistemas de solventes avaliados, o mais eficaz para a extração do biossurfactante foi o sistema clorofórmio/metanol na proporção 1:8:8 (extrato concentrado:clorofórmio:metanol), onde foi encontrada produção de 7,92 g.L<sup>-1</sup> de biossurfactante utilizando a glicerina bruta e 6,85 g.L<sup>-1</sup> utilizando CACJ.

✓ Quando comparados ambos os biossurfactantes, o produzido a partir da glicerina bruta apresentou CMC de 1,77 g.L<sup>-1</sup> e concentração de proteínas de 13,04%, enquanto o produzido a partir do suco de caju apresentou CMC de 7,85 g.L<sup>-1</sup> e concentração de proteínas de 9,35%, mostrando que o primeiro apresenta melhores propriedades emulsificantes do que o segundo.

✓ A análise dos estudos de estabilidade utilizando processamento digital de imagem indica que não foi possível determinar os principais mecanismos de envelhecimento das emulsões estudadas. Todas as amostras mantiveram-se praticamente estáveis até ao fim dos 45 dias de armazenamento. A emulsão preparada apenas com o bioemulsificante produzido por glicerina bruta apresentou a distribuição do tamanho de micelas mais homogênea.

✓ A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o biossurfactante produzido a partir da levedura *Y. lipolytica* utilizando meio de cultivo contendo glicerina bruta apresentou os melhores resultados e, portanto, este pode ser possivelmente utilizado no futuro como uma alternativa, ou mesmo como um substituto, de emulsificantes comerciais.

# SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

- ✓ Realizar novos estudos de caracterização para os biossurfactantes produzidos, como o potencial zeta e o ângulo de contato;
- ✓ Analisar a quantidade de ácidos graxos através de cromatografia gasosa;
- ✓ Investigar os grupos funcionais presentes nos biossurfactantes, bem como suas estruturas moleculares através de análises em FT-IR e RMN;
- ✓ Testar novas formulações de emulsões com componentes diferentes da Goma Arábica e mais próximos dos componentes utilizados industrialmente em formulações cosméticas;
- ✓ Encontrar as CMCs por meio da tensão superficial e comparar os resultados com os obtidos pela titulação turbidimétrica;
- ✓ Estudar a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes;
- ✓ Estudar a reologia dos biossurfactantes;
- ✓ Realizar um experimento em um biorreator, com a finalidade de aumentar a escala de produção;
- ✓ Avaliar o potencial de aplicação dos biossurfactantes na indústria de Cosméticos;
- ✓ Avaliar a viabilidade econômica dos biossurfactantes produzidos;
- ✓ Como melhorar a performance dos biossurfactantes na indústria cosmética.

# REFERÊNCIAS

---

ABED, M. A.; SAXENA, A.; BOHIDAR, H. B. (2004). Micellization of alpha-olefin sulfonate in aqueous solutions studied by turbidity, dynamic light scattering and viscosity measurements. *Colloids Surface A: Physicochemistry Engineering Aspects*, v. 233, n. 1, p. 181-187.

AMARAL, P. F. F. (2007). Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. (2006). Production and Characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochemistry*, v. 41, n. 8, p. 1894-1898.

ANVISA. (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, Brasília, v. 1, p. 52. Brasil. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia\\_series.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm)>. Acessado em 10/11/2013.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, n. 26, p. 56-62.

AULTON, M. E. (2005). Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 677.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. (2000). Potencial commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiololy Biotechnology*, v. 53, p. 495-508.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, v. 26, p. 413-416.

BARBOSA, S. A. (2011). Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Sergipe.

BARROS, F. F. C.; DE QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 409-414.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 19, p. 219-237.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZK, M.; TOMASIK, J.; PLSZCZYK, M. (2004). Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 15-18.

BESSA, E. (2009). Adendo aos produtos de limpeza. Disponível em: <<http://lablogatorios.com.br>>. Acessado em 10/11/2013.

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

BONI, L. A. B. (2008). Tratamento da glicerina bruta e subprodutos obtidos da reação de transesterificação de sebo bovino utilizada para a produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado, Universidade Luterana do Brasil.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 50, p. 520.

CAMPOS, D. C.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. (2002). Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination*, v. 148, p.61-65.

CARA, D. V. C. (2009). Produção de biossurfatante por *Flavobacterium sp.* a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CERESANA RESEARCH. Market Intelligent, consulting. (2012). Disponível em: <<http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/surfactants/>> Acessado em: 15/11/2013.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 170, p. 569-574.

CHAVÉZ, J. D. R. (2008). Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo.

CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTA ANNA, L. M. M.; SANTOS, A. S.; FREIRE, D. M. G.; PEREIRA, N. J. (2007). Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 131, n. 1-3, p. 880-886.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. (1984). Isolation of bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 747-750.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Méndez-Vilas, A. (ed.), Formatex Research Center, v. 2, p. 930-944.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. (2003). Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, Rio Grande, v. 13, p. 85-103.

CONSIGLIERI, V. O. (2002). Farmacotécnica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 4.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D. A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 984, n. 1, p. 173.

COSMETICS BUSINESS. (2012). Brazilian surfactants market to reach \$1.9bn in 2018. Disponível em <[http://www.cosmeticsbusiness.com/news/article\\_page/Brazilian\\_surfactants\\_market\\_to\\_reach\\_19bn\\_in\\_2018/81546](http://www.cosmeticsbusiness.com/news/article_page/Brazilian_surfactants_market_to_reach_19bn_in_2018/81546)>. Acessado em 15/11/2013.

COSTA, G. A. N. (2005). Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

CUBITTO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; SCHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SIÑERIZ, F. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, v.15, p. 281-287.

DA CRUZ, J. F. (2012). Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar. Tese de Mestrado, Universidade Federal da Bahia.

DA SILVA, L. V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. (2012). Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* in different crude glycerol concentrations and in different nitrogen sources. Chemical Engineering Transactions, v. 27, p. 199-204.

DANTAS, M. A. (2010). Análise do desempenho de um queimador infravermelho funcionando com gás liquefeito de petróleo e glicerina. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. (2005). Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. Applied Catalist A-Gen, v. 28, p. 225-323.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C. (1999). The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enzyme and Microbial Technology, v. 25, p. 322-329.

DE ALMEIDA, L. T.; DE BRITO, A. C. F.; ALMEIDA, D. M.; MONTEIRO, S. A. (2011). Produção de extrato bruto de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em meio com glicerol e óleo de soja residual. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindústria, v. 05, p. 442-449.

DICKINSON, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids, v. 17, n. 1, p. 25-39.

DOMÍGUEZ, A.; FERMINAN, E.; GAILLARDIN, C. (2000). *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. Contributions to Microbiology, v. 5, p. 151-172.

DUJON, E. P. (2004). Genome evolution in yeast. Nature, v. 430, p. 35-43.

DUTRA, K. R. (2010). Transição dimórfica em *Yarrowia lipolytica*: ação da auxina e óxido nítrico. Tese de mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

FARIA, A. F. (2010) Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

FARIAS, C. B. B.; SARRUBO, L. A. (2006). Otimização das condições de produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* utilizando óleo de canola e glicose

como substratos. 3ª Semana de Integração Universidade Sociedade e 7ª Jornada de Iniciação Científica, UNICAP, p. 21-26.

FICKERS, P.; BENETTI, P.-H.; WACHÉ, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M. S.; NICAUD, J.-M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 6-7, p. 527-543.

FONTES, G. C. S. (2008). Produção de biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FONTES, G. C. S.; RAMOS, N. M.; AMARAL, P. F. F.; NELE, M.; COELHO, M. A. Z. (2012). Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, n. 3, p. 483-493.

FRANCO, P. F. (2011). Biodiesel, glicerol e microorganismos. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/biodiesel-glicerol-e-microorganismos-1/>>. Acessado em 19/11/2013.

FREIRE, M. G.; DIAS, A. M. A.; COUTINHO J. A. P.; COELHO M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. (2005). Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 286, p. 224-232.

GARCIA, M. M. T. (2008). Avaliação da estabilidade do extrato hidrossolúvel de soja enriquecido de cálcio e vitaminas c e d através do processamento digital de imagens. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GRANGEMARD, I.; WALLACH, J.; PEYPOUX, F. (1999). Evidence of surfactin hydrolysis by a bacterial endoprotease. *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 241-244.

GUSEV, A. I.; KHOKHLOV, A. R.; GOVORUN, E. N. (2009). Micelle. Glossary of nanotechnology and related terms. Disponível em: <<http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199>>. Acessado em 10/11/2013.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; SAAVEDRA, G. A.; RODRIGUES, S. (2007). Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1409-1415.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2004). Vocabulário básico de recursos naturais e meio ambiente, 2ª Ed. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/vocabulario.pdf>, acessado em 10/11/2013.

KAWASSE, F. M.; AMARAL, P. F. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z. (2003). Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 25, p. 371–375.

KILE, D. E.; CHLOU, C. T. (1989). Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration. *Environmental Science and Technology*, v. 23, p. 832-838.

KIRK-OTHMER, E. T. (2007). Glycerol. In: American Society of Chemistry. *Encyclopedia of chemical technology*. 5ª Ed. New York: Edit. John Wiley.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 3, p 187-201.

KRONEMBERGER, F. A. (2007). Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LORENA, S. (2013). Glicerina. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/glicerina/>>. Acessado em 10/11/2013.

MACHADO JUNIOR, F. R. S. (2010). Conversão por via biotecnológica de glicerina residual em biomassa de leveduras como fonte de proteínas e lipídios. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande.

MACIEL, L. (2013). Poderes do caju. Disponível em: <<http://revistavivasaude.uol.com.br/guia/poderes-do-caju/74/>>. Acessado em 14/11/2013.

MAIER, R. M. (2003). Biosurfactants: evolution and diversity. *Advances in Applied Microbiology*, v. 52, p. 101-121.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 4, p. 428-434.

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

MANEERAT, S. (2005). Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, p. 675-683.

MANIASSO, N. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 87-93.

MARTINA, M. C. (2005). *Introducción a la dermofarmacia y a la cosmetología*. Zaragoza, Editorial Acribia, S.A.

MARTINS, A. C. G. (2011). *Valorização de borra de café através da produção de biossurfactantes*. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.

McCLEMENTES, D. J. (1999). *Food Emulsions principles, practice, and techniques*. London, Food Science Biochemistry Food Chemistry, v. 186, p. 249.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. (2004). Technical aspects of production by transesterification: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, p. 248-255.

MEIRA, J. A. (2007). *Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

MELLO, F. O. T.; PAULILLOS, L. F.; VIAN, C. E. F. (2007). O biodiesel no Brasil: panorama, perspectivas e desafios. *Informações Econômicas*, v. 37, n. 1.

MELO, E. G. V. (2011). *Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclasticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos*. Tese de Mestrado, Universidade Federal da Bahia.

MILLER, G. L. (1959). Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.

MOHANTY, S.; RAY, P.; SWAIN, M. R.; RAY, R. C. (2006). Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale L.*) "apple" into wine. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 30, n. 3, p. 314-322.

MORÁN, A. C.; OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SIÑERIZ, F. (2000). Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by the addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation*, v. 11, p. 65.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. (2007). Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 104, n. 1, p. 78-81.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, v. 24, p. 509-515.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. (1999). Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology*, v. 33, p. 3812-3820.

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

OLIVEIRA, J. S.; ANTONIASSI, R.; DE FREITAS, S. C.; MÜLLER, M. D. (2013). Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. *Ciência Rural*, v.43, n.3, p. 509-512.

OLIVEIRA, F. J. S.; VAZQUEZ, L.; DE CAMPOS, N.; DE FRANÇA, F. (2006). Biosurfactants production by *Pseudomonas aeruginosa* FR using palm oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 131, p. 727-737.

OOI, K. T.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z. (2004). Glycerol residue: a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. *Journal of Oleo Science*, v. 53, p. 29-33.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTI, D. S.; NETO, R. M. S. (2000). Aproveitamento industrial do caju. Fortaleza: CNPAT/SEBRAE/EMBRAPA, p. 85.

PALOMINO-ROMERO, J. A.; LEITE, O. M.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZARBANDA, G. R.; SILVA, D. CAVALCANTI, E. B. (2012). Tratamentos dos efluentes gerados na produção de biodiesel. *Química Nova*, v. 35, n. 2, p. 367.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; DA SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; DA SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. (2008). Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 2.

PINHO, L. X. (2009). Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale l.*) para alimentação humana. Tese de mestrado, Universidade Federal do Ceará.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.. LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE. J. B. (2005). Biodiesel: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6b, p. 1313-1330.

PIRÔLLO, M. P. S. (2006). Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.

PORTAL BRASIL. (2011). Biodiesel. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2011/11/biodiesel>>. Acessado em 18/11/2013.

PRATES, C. P.; PIEROBON, E. C.; COSTA, R. C. (2007). Formação do mercado de Biodiesel no Brasil. BNDES setorial, Brasil.

PROMMACHAN, O. (2002). Production and application of biosurfactant from *Bacillus* MUV4. Tese de Mestrado, Prince of Songkla University, Tailândia.

QUEIROZ, A. A.; MARTINS, J. A. S.; DA CUNHA, J. P. A. R. (2008). Adjuvantes e qualidade da água na aplicação de agrotóxicos. *Bioscience Journal*, v. 24, n. 4, p. 8-19.

RIBEIRO, H. M. (2006). Teoria de estabilidade de emulsões cosméticas. *Cosmetic & Toiletries*, v. 14, n. 4, p.88-90.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; DA SILVA, S. S. (2008). Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 37, p. 44-51.

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

ROCHA, M. V. P. (2007). Produção de biossurfactantes por fermentação submersa de substrato não convencional. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Ceará.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. (2007). Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju, 4ª PDPETRO, Campinas, SP.

ROCHA, M. V. P.; GOMES, R. V.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. (2009). Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 155, n 1-3, p. 366-378.

ROCHA, M. V. P. (2010). Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale l.*) por fermentação submersa. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

RUFINO, R. D. (2006). Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco.

RUPP, S.; ZIBEK, S. (2011). BioSurf - Novel production strategies for biosurfactants. Disponível em: <<http://www.biosurf.fraunhofer.de/about/index.html>>. Acessado em 21/11/2013.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; DUTRA JUNIOR, T. V. D.; NETO, E. L. B. (2007). Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 4º PDPETRO, Campinas, SP.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2001). Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 95, p. 59.

SILVA, L. V., RIBEIRO, R., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z., PESSOA, F. L. P. (2010b). Potential application of raw glycerol from biodiesel in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. 2<sup>nd</sup> International Conference on Industrial Biotechnology, Chemical Engineering Transactions, v. 20, Padua, Itália.

SILVA, K. A.; ROCHA-LEÃO, M. H.; COELHO M. A. Z. (2010a). Evaluation of aging mechanisms of olive oil–lemon juice emulsion through digital image analysis. Journal of Food Engineering, v. 97, p. 335-340.

SILVA, E. C.; SOARES, I. C. (1996). Tecnologia de emulsões. Cosmetics & Toiletries, v. 8, n. 5, p. 37-46.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends in Biotechnology, v. 22, n. 3, p. 142-146.

SJÖBLOM, J. (1996). Emulsion and Emulsion Stability. Surfactant Science, v. 61. Dekker, New York.

SOBRINHO, H. B. S. (2007). Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Tese de Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco.

SOUSA, J. R.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. (2007). Avaliação de microrganismos quanto à conversão do glicerol obtido do processo de produção do biodiesel em biossurfactantes. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, Curitiba.

SOUZA, M. C. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P., GONÇALVES, L. R. B. (2005). Avaliação de suco de caju como substrato para o cultivo submerso de

*Pseudomonas aeruginosa*. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas.

SOUZA, F. A. S. D.; SALGUEIRO, A.; ALBUQUERQUE, A. C. D. C. (2012). Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, n. 1, p. 61-67.

SOUZA, P. A.; SIMÕES, A. N.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; MENDONÇA, F. V. S. (2002). Caracterização química de pedúnculos de caju 'CCP-76' em diferentes estágios de desenvolvimento. XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém.

SWEEDMAN, M. C.; TIZZOTTI, M. J.; SCHÄFER, C.; GILBERT, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: a review. Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 905-920.

SZABO, R.; ŠTOFANIKOVÁ, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Letters, v. 206, p. 45-50.

THOMPSON, J. C.; HE, B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering Agriculture, v. 22 n. 2, p. 261-265.

TNT SUSTENTÁVEL. (2013). A força do biodiesel. Disponível em: <<http://www.tnsustentavel.com.br/biodiesel>>. Acessado em 20/11/2013.

TOREN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. (2001). Emulsifying activities of purified algal proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 1102-1106.

TOSIN, F. F. S. (2008). Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus persica*: caracterização estrutural e análises reológicas. Tese de Pós-doutorado, Curitiba.

TRINDADE, J. R.; FREIRE, M. G.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M. (2008). Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects, v. 324, p. 149-154.

VAN BOGAERT, I.; SAERENS, K.; DE MUYNCK, C.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 76, p. 23-34.

VAN DEN TEMPEL, M. (1953). *Receuil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, v. 72, p. 433-442.

VAN GERPEN, J. (2002). Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, v. 86, p. 1097-1107.

VIDAL, A. P. R. A.; CARVALHO, J. T.; BASÍLIO, M. P. B. (2010). Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* em meio com glicerol visando sua futura aplicação na recuperação de petróleo. Projeto final de curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

VIVEK, M. N.; MANASA, M.; PALLAVI, S.; SWAMY, H. C. S.; KEKUDA, T. R. P. (2013). Antibacterial potential of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) juice against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Science, Technology and Arts Research Journal*, v.2, n 3, p. 144-146.

VOLKERING, F.; BREURE, A.; RULKENS, W. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, v. 8, p. 401-417.

WILKINSON, M. H. F. (1998). Automated and manual segmentation techniques in image analysis of microbes, In: *Digital Image Analysis of Microbes*, eds. Wilkinson, M.H.F. & Schutt, F., John Wiley & Sons, UK.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. (1996). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v. 7, n. 5, p. 415-423.

ZINJARDE, S. S., PANT, A. (2002). Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, *Journal of Basic Microbiology*, v. 42, p. 67-73.

ZHOU, C.-H.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y.-X.; LU, G. Q. (2008). Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, v. 37, n. 1, p. 527-549.