



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Mitaliene de Deus Soares Silva

**Produção de biossurfactantes por leveduras isoladas do pólen
apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do baixo
Amazonas - AM**

RECIFE

2013

Mitaliene de Deus Soares Silva

**Produção de biossurfactantes por leveduras isoladas do pólen
apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do baixo
Amazonas - AM**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade Animal para a obtenção do
Grau de Mestre em Biodiversidade Animal.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira
Co-Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

RECIFE
2013

Ficha catalográfica

S586p Silva, Mitaliene de Deus Soares
Produção de biossurfactantes a partir de leveduras isoladas do pólen apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do Baixo Amazonas – AM / Mitaliene de Deus Soares Silva. – Recife, 2013.
65 f. : il.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.
Referências.

1. Biossurfactante 2. Levedura 3. Óleo de soja 4. Milhocina 5. Placket-Burman 6. Estabilidade 7. Toxicidade
I. Moreira, Keila Aparecida, orientadora II. Título

CDD 636.089

**Produção de biossurfactantes por leveduras isoladas do pólen
apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do baixo
Amazonas - AM**

Mitaliene de Deus Soares Silva

Examinadores:

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (Orientadora)
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG

Profa. Dra. Polyanna Nunes Herculano
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Defendida dia 25 de Fevereiro de 2013

Agradecimentos

À Deus pela onipresença no meu coração em todo momento da minha vida.

À minha família, minha mãe Josefa, meu pai Milton, minha irmã Mikaelle e meu irmão Mikael que estão sempre como meu esteio.

Ao meu noivo Clayton Santana, por ser meu companheiro e meu conforto em todas as horas.

À minha orientadora Keila Aparecida Moreira, pela oportunidade e por ser mais que uma ótima orientadora, ser uma amiga, que eu quero ter sempre ao meu lado.

À minha co-orientadora Ana Lúcia Porto, por acreditar em mim e me apoiou desde o comecinho da minha entrada nessa nova área.

A minha parceira Ana Paula, pela ajuda, conselhos e amizade sincera.

A professora Polyanna Nunes pela ajuda, disponibilidade e boa vontade comigo durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do LABTECBIO, principalmente Patyanne, Meire, Gabriela, Michely pelas palavras amigas, companhia nos momentos difíceis e descontração nos momentos necessários.

Aos colegas que tenho na UAG, Patrícia Lins por te me apresentado à minha orientadora e à Biociência Animal e pela simpatia e incentivo, Talita Camila e Sheylla Araújo pela ajuda e descontração.

Ao grupo de pesquisa da professora Leonie Asfora pelo acolhimento em seu laboratório.

A Fundação de Apoio à Ciência e à Tecnologia do Estado de Pernambuco pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Capítulo 1	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Biossurfactantes	12
3.2 Classificação dos biossurfactantes	12
3.3 Aplicação dos biossurfactantes	14
3.4 Produção dos biossurfactantes	15
3.5 Micro-organismos produtores de biossurfactantes	19
REFERÊNCIAS	21
Capítulo II	33
Artigo	34
RESUMO	35
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Micro-organismos	38
2.2 Seleção do micro-organismo produtor de biossurfactante	38
2.3 Teste de dispersão e agregação do óleo	39
2.4 Determinação da tensão superficial	39
2.5 Seleção da fonte de carbono de baixo custo para a produção de biossurfactante	39

2.6	Otimização da Produção de biossurfactante através do modelo Plackett–Burman	40
2.7	Índice de emulsificação (IE ₂₄)	41
2.8	Cinética de crescimento e produção de biossurfactante	41
2.9	Determinação da estabilidade do biossurfactante	41
2.10	Extração e rendimento do biossurfactante bruto	42
2.11	Atividade de fitotoxicidade	42
2.12	Atividade de toxicidade frente á <i>Artemia salina</i>	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
3.1	Seleção do micro-organismo produtor e da fonte de carbono de	43
3.2	Otimização da produção de biossurfactante	44
3.3	Cinética de crescimento da levedura e produção de biossurfactante	46
3.4	Índice de emulsificação	47
3.5	Estabilidade do biossurfactante	48
3.6	Toxicidade do biossurfactante	48
4	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	Tabelas	53
	Figuras	59

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, com caráter tensoativo, produzidas por uma ampla variedade de bactérias e leveduras. Essa classe de moléculas forma uma película nas interfaces da superfície do líquido com o ambiente através da orientação de grupos polares e apolares, de acordo ao caráter hidrofílico/hidrofóbico da superfície. Essa interação de biossurfactantes com uma superfície de substrato altera a característica hidrofóbica da superfície, interferindo na adesão microbiana e na desorção de processos (MONTEIRO et al., 2011; MORITA et al., 2011).

A maioria dos surfactantes produzidos é derivada do petróleo, tóxicos e em geral não são degradados por micro-organismos, sendo um potencial poluidor ambiental. Esses perigos têm chamado atenção para a produção de surfactantes de origem microbiana, pois estes têm atraído a atenção da produção de biossurfactantes por serem menos agressivos ao ambiente (KIRAN et al., 2009; RUFINO et al., 2011).

As vantagens de uso dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos são diversas, tais como menor toxicidade, biodegradabilidade e maior estabilidade em temperaturas ou pHs extremos (VAZ et al., 2012). Podem ser utilizados em diferentes aplicações industriais tais como: indústrias de medicamentos, cosméticos, petroquímica, alimentícias e nas áreas de proteção ao meio ambiente (BANAT et al., 2010; RUFINO et al., 2011). Entretanto, para que a produção seja realizada em larga escala é preciso estabelecer processos de fermentação e técnicas de separação de baixo custo e alta eficiência (WINTERBURN; RUSSELL; MARTIN, 2011).

Os micro-organismos apresentam uma diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas. Na exploração desta diversidade, além de outras moléculas, obtêm-se substâncias bioativas, como os biossurfactantes através de processos biotecnológicos, que vem contribuindo para a melhoria da qualidade de vida, mediante a produção e a aplicação destas substâncias, como agentes emulsionantes e antimicrobianos (BON et al., 2008).

Dentre esses micro-organismos as leveduras como as espécies de *Candida* que têm sido empregadas com frequência na produção de biossurfactantes (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). As leveduras são reconhecidas pela sua diversidade morfológica e bioquímica, podendo ser encontradas em diversos ambientes naturais, como matéria orgânica em decomposição, água doce e salgada e solo. As leveduras são heterotróficas, pois necessitam de matéria orgânica elaborada para sua nutrição; a absorção dos nutrientes por esses micro-organismos ocorre pela ação de enzimas que hidrolisam as macromoléculas e permitem sua assimilação através dos mecanismos de transporte ativo e passivo (LACHANCE et al., 1998; LACAZ et al., 2002).

Devido às vantagens apresentadas pelo uso de surfactantes de origem microbiana e crescente procura de processos de produção de baixo custo, é fundamental a descoberta de micro-organismos produtores de biossurfactantes, de desenvolvimento de novos processos de produção e aplicações para ampliar a utilização desses biocompostos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir biossurfactante por levedura isolada de pólen apícola de *Mellipona seminigra merrillae* da região do Baixo Amazonas – AM, utilizando meio de produção de baixo custo.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar dentre 20 culturas de leveduras isoladas de pólen apícola de *M. seminigra merrillae*, a melhor produtora de biossurfactante;
- Selecionar a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactante por leveduras isoladas do pólen apícola;
- Otimizar a produção do biossurfactante produzido pela levedura selecionada através do modelo de planejamento estatístico Plackett-Burman;
- Avaliar a cinética de crescimento e de produção do biossurfactante produzido pela levedura selecionada;
- Calcular o índice de emulsificação e a tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante ;
- Definir o rendimento do biossurfactante bruto produzido pela levedura selecionada;
- Determinar a estabilidade do biossurfactante produzido quanto a diferentes temperaturas, pHs e concentrações de cloreto de sódio;

- Avaliar a fitotoxicidade do biossurfactante produzido pela levedura selecionada frente a sementes de *Lactuca sativa* L., *Brassica oleracea* L. e *Coriandrum sativum* L.;
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante frente ao microcurstáceo *Artemia salina*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes

Biossurfactantes são polímeros, totalmente ou parcialmente extracelulares, que podem ser produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (XIA et al., 2011). Apresentam-se como moléculas anfipáticas com estrutura de composição hidrofóbica e hidrofílica, características que lhes permitem formar micelas que se acumulam na interfase entre líquidos de diferentes polaridades tais como água e óleo, reduzindo assim a tensão superficial e tensão interfacial, facilitando a absorção de hidrocarbonetos à produção de micelas e micro emulsões (THAVASI et al., 2009; CHEN et al., 2010; CHANDRAN; DAS, 2010; VAZ et al., 2012).

As vantagens dos biossurfactantes incluem biodegradabilidade elevada, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica. As propriedades dos biossurfactantes incluem seletividade e atividade específica em extremos de temperaturas, pH e salinidade (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2009; PRIYA; USHARANI, 2009; CHANDRAN; DAS, 2010; CHANDRAN; DAS, 2011).

3.2 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes ocorrem na natureza na forma de moléculas complexas, tais como: glicolipídeos, fosfolipídeos e lipopeptídeos, complexos de proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos, lipopolissacarídeos e lipídeos de polioliol (MUKHERJEE; DAS; SEM, 2006; PATTANATHU; GAKPE, 2008; DAS; MUKHERJEE; SEN, 2009; PRIYA; USHARANI, 2009).

Suas estruturas compreendem duas partes: a porção hidrofóbica da molécula com longa cadeia de ácidos graxos, ácidos graxos hidroxilados ou um ácido graxo alquil- β -hidroxila e a porção hidrofílica, que pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (KHOPADE et al., 2012a). Os biossurfactantes também podem ser classificados de acordo com a sua propriedade iônica em água: aniônicos, não iônicos, catiônicos e anfotéricos (VAZ et al., 2012).

Dentre os biossurfactantes mais conhecidos podemos destacar o ramnolípido, a surfactina e também o soforolípido. Ramnolípido é um glicolípido, em que uma ou duas moléculas de ramnose estão ligadas a uma ou duas moléculas de ácido hidroxi-decanóico, enquanto que o grupo hidroxila de um dos ácidos está envolvido na ligação glicosídica com a extremidade redutora do dissacarídeo ramnose, o segundo grupo hidroxila do ácido está envolvido na formação do éster (PRIYA; USHARANI, 2009).

A surfactina, o lipopeptídeo mais conhecido produzido por *Bacillus subtilis*, é uma molécula cujos dois grupos funcionais consistem em uma longa cadeia de ácido graxo alfa-hidroxilado e uma curta cadeia peptídica de sete resíduos de aminoácidos. Existem três tipos diferentes de surfactinas (A, B e C), que são classificadas de acordo com as diferenças nas suas sequências de aminoácidos (RODRIGUES et al., 2006; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

A molécula soforolípido consiste no dissacarídeo soforose (2-S-13-D-glucopiranosil-13-D-glucopiranosose) com o carbono 6' e 6" do grupo hidroxila acetilado ligado ao ácido graxo por meio de uma ligação glicosídica entre o

carbono 1' e o carbono 1 de um ácido graxo de cadeia longa (CHANDRAN; DAS, 2011).

3.3 Aplicações dos biossurfactantes

A utilização dos biossurfactantes na natureza ainda não são tão claros, mas sabe-se que atuam aumentando a absorção de nutrientes nos substratos hidrofóbicos, aumentando o crescimento em superfícies hidrofóbicas e na formação de biofilmes (CHANDRAN; DAS, 2011). Eles são utilizados em diferentes indústrias, na tecnologia de alimentos, no segmento farmacêutico, agricultura, cosméticos, de produtos para higiene pessoal, produtos de limpeza e na petroquímica (JOSHI et al., 2008; BAO et al., 2009; LOTFABADA; SHOURIANC; REZA, 2009; VAZ et al., 2012).

Os biossurfactantes também podem ser utilizados na recuperação de solos e águas contaminadas por hidrocarbonetos (PRIYA; USHARANI, 2009; SOTIVORA et al., 2009; NAKANO et al., 2011; KHOPADE et al., 2012b). Apenas 30% do óleo presente no reservatório de petróleo poder ser recuperado através de técnicas de recuperação primária e secundária (XIA et al., 2011), sendo o MEOR (recuperação microbiana de óleo melhorada) uma alternativa estudada nesta recuperação do óleo (BAO et al., 2009; XIA et al., 2011; NAKANO et al., 2011; SHAVANDIA et al., 2011; GHOJAVAND; VAHABZADEH; KHODABANDEH, 2012).

Nos últimos anos, essas moléculas foram estudadas por possuir várias propriedades interessantes na terapêutica e na biomedicina (DAS; MUKHERJEE, SEM; 2008, KHOPADE et al., 2012b) com atividades

antimicrobiana, antitumoral e antiviral (PRIYA; USHARANI, 2009; KHOPADE et al., 2012a).

A surfactina pode também inibir a formação de fibrina do coágulo sanguíneo, induzir a formação de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica e inibir a adenosina cíclica monofosfato (cAMP). Além disso, existem relatos de ação antiviral da surfactina, devido a uma interação físico-química entre o surfactante e a membrana lipídica do vírus (ABOUSEOUD et al., 2008).

Os soforolípeos e seus derivados são relatados por diminuir a gravidade da asma em um modelo *in vivo* (BLUTH et al., 2008), demonstrar efeito letal contra células cancerosas humanas pancreáticas (FU et al., 2008), atuar como agentes terapêuticos com propriedades espermicidas (GROSS; DONCEL; SHAH, 2004), atividade anticancerígena (SCHOLZ et al., 1998) e atividade antibacteriana (REETIKA; KUMAR; ASMITA, 2012). Os biossurfactantes apresentam diversas aplicações, havendo a necessidade de encontrar diferentes micro-organismos produtores e alternativas de biossíntese destes biocompostos.

3.4 Produção dos biossurfactantes

A ampla aplicação dos biossurfactantes tem sido limitada pelo seu alto custo de produção e baixo rendimento. Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos em função de seu alto custo de produção, associado a processos ineficientes de recuperação e purificação (ROCHA et al., 2006). Portanto, apenas alguns, como a surfactina, são produzidos em escala industrial (SHETE et al., 2006). A fim de reduzir os custos de produção e aumentar a sua

competitividade, vários pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de novos e mais baratos processos e/ou utilização de matérias-primas de baixo custo (PORTILLA-RIVERA et al., 2008; DAS; MUKHERJEE; SEN, 2009; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; VAZ et al., 2012).

Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, fungos filamentosos ou leveduras a partir de vários substratos, incluindo açúcares, glicerol, óleos, hidrocarbonetos e resíduos agrícolas (KHOPADE et al., 2012b). De acordo com Bordoloi e Konwar (2009), a espontânea liberação e produção de biossurfactantes estão muitas vezes relacionadas à absorção de hidrocarbonetos. Logo, a utilização do substrato com fonte de carbono é um fator limitante na produção de surfactantes microbianos. O tipo de fonte de carbono utilizada tem sido relatado como influência tanto na qualidade quanto na quantidade dos biossurfactantes produzidos (PANILAITIS et al., 2007; ABOUSEOUD et al., 2008).

Essas substâncias bioativas podem ser produzidas *in situ* por inoculação do micro-organismo no local de atuação do biossurfactante ou *extra situ* por adição do biossurfactante previamente produzido em outro local (CARRILO et al., 2003). A biodegradação de moléculas de superfície ocorre quando os micro-organismos utilizam muitos compostos não degradáveis como fonte de carbono e energia (LIMA et al., 2011).

Os micro-organismos produzem biossurfactantes, como uma mistura de várias isoformas que podem variar na porção carboidrato e peptídeo e/ou no comprimento da cadeia ou na ramificação da porção lipídica da molécula (PERFUMO et al., 2006; DAS; MUKHERJEE; SEN, 2009).

Para reduzir os custos de produção, diferentes alternativas poderiam ser investigadas como o aumento dos rendimentos, o desenvolvimento de processos econômicos e da utilização de matéria-prima de baixo custo para o crescimento do micro-organismo e conseqüentemente produção do surfactante. A escolha de matérias-primas torna-se viável para a economia global do processo, pois correspondem à 50% do custo final do produto, o que contribui com a redução dos resíduos depositados no ambiente ou na despesas com tratamento dos mesmos (KOKARE et al., 2007; MANEERAT; PHETRONG; SONG, 2007).

Uma estratégia que está sendo bastante utilizada é a utilização de substratos de origem renovável como fonte de carbono. (FONTES et al., 2008). Os óleos vegetais são fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros (SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006). Alguns micro-organismos produtores de biossurfactantes e os tipos de óleos utilizados são listados na Tabela 1.

Tabela 1. Micro-organismos produtores de biossurfactante com uso de óleos vegetais como fonte de carbono.

Óleo vegetal	Micro-organismo	Referência
Óleo de oliva	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aboseuoud et al., 2008
		Aboseuoud et al., 2010
	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	Fukuoka et al., 2008b
	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	Konishi et al., 2010
		Konishi et al., 2011
	<i>Pseudomonas sp. e</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Darvish et al., 2011
Óleo de soja	<i>P. aeruginosa</i> LBI	Gomes; Nitschke, 2012
	<i>P. putida</i>	Pei; Zhan; Zhou, 2009
	<i>Candida lipolytica</i>	Rufino et al., 2011
Óleo de amendoim	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Thavasi; Jayalakshmi; Banat, 2011
	<i>C. sphaerica</i> UCP0995	Sobrinho et al., 2008
Óleo de palma	<i>Pseudomonas sp.</i>	Nawawi; Jamal; Alam, 2010
Óleo de girassol	<i>Trichosporon montevideense</i>	Monteiro et al., 2011
Óleo de colza	<i>P. koreensis</i>	Hultberg; Holmkvist; Alsanius, 2011
Óleo de semente de algodão	<i>C. glabrata</i>	Sarubbo; Luna; Campos-Takaki, 2006
		Luna; Sarubbo; Camos-Takaki, 2009
Óleo de milho	<i>C. ingens</i>	Amézcua-Vega et al., 2007

O aproveitamento de resíduos com substratos apresenta relevância na redução de custos na produção de biocompostos surfactantes. Segundo Wang et al. (2011) o *Penicillium expansum* produz ramnolipídeo a partir de palha de trigo triturada. Luna et al. (2008) utilizaram milhocina como componentes do

meio para produzir biossurfactante pela levedura *C. sphaerica*. O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LB5a utilizou manipueira como meio de cultivo (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008). Foi utilizado óleo reusual de soja por *Klebsiella* sp. (LEE et al., 2008), de girassol e caldo de abacaxi para produção por *Pseudomonas flourescens* (LIMA et al., 2010). O melaço foi substrato para produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 e *Bacillus* sp. HS3 (JOSHI et al., 2008) e por *Leucobacter komagatae* 183 (SAIMMAI; SOBHON; MANEERAT, 2012). A produção do biossurfactante por *B. subtilis* LSFM 05 foi realizado com glicerol (FARIA et al., 2011) assim como o micro-organismo *Variovorax paradoxus* (FRANZETTI et al., 2012).

3.5 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Vários micro-organismos, tais como, bactérias e fungos (incluindo as leveduras) são conhecidos por produzir tipos específicos de biossurfactantes (KIRAN et al., 2009). Mesmo encontrando maiores relatos de bactérias produtoras, é ascendente o número de leveduras com essa característica, se destacando o gênero *Candida* sp., como *C. ingens* (AMÉZCUA-VEJA et al., 2007), *C. bombicola* (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2011a; FELSE et al., 2007) e *C. glabrata* (SARUBBO et al., 2006; LUNA et al., 2009) seguido pelo gênero *Pseudozyma*, como *P. antarctica*, *P. tsukubaensis* e *P. hubeiensis* (FUKUOKA et al., 2011; KONISHI et al., 2011).

Muitas espécies de leveduras são conhecidas por produzir soforolípidos, glicolípídios extracelulares, quando cultivadas em fontes de carbono, tais como glicose e ácidos graxos de cadeia longa, e diferentes fontes de nitrogênio

(CHANDRAN; DAS, 2011). Os sofrólípidos são relatados por serem secretados pelas leveduras *Wickerhamiella domercqiae* (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a), *Rhodotorula muciliginosa*, *C. rugosa* (CHANDRAN; DAS, 2011), *C. bombicola* (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009b; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2011b).

Outro biossurfactante relatado é o manosileritritol (MEL) que é um glicolípido promissor produzido a partir de óleos vegetais e açúcares, por leveduras, do gênero *Pseudozyma* (FUKUOKA et al., 2011). FUKUOKA et al. (2008a) relataram que o *P. tsukubaensis* produziu o diastereoisômero do MEL -B quando cultivado usando óleo de oliva. Fukuoka et al. (2008b) reportaram que o *P. crassa* produziu diastereoisômeros dos MELs -A, -B e -C (Figura 1) a partir de óleo de soja.

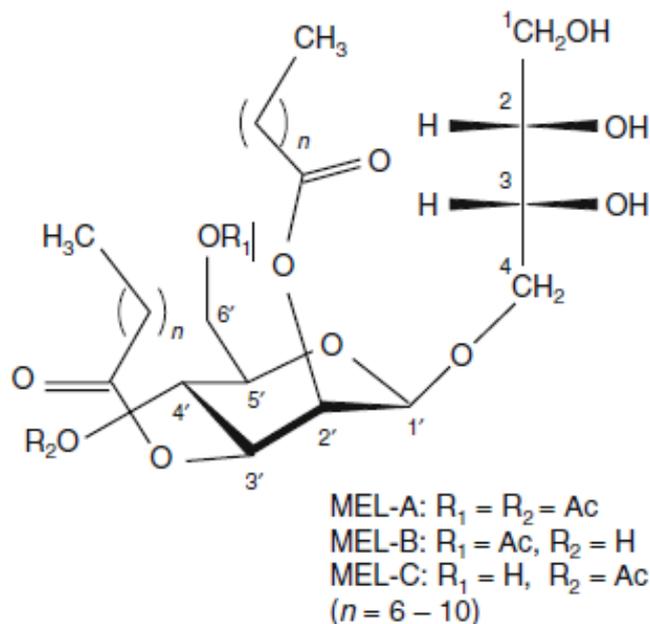


Figura 1. Estrutura química dos lipídeos manosileritritol -A, -B e -C. (Fonte: MORITA et al., 2009).

REFERÊNCIAS

AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H.M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresour Technol**, 98, 237-240, 2007.

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

ABOUSEOUD, M.; YATAGHENE, A.; AMRANE, A.; MAACHI, R. Production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* – solubilizing and wetting capacity. **Chem Eng Transactions**, 20, 291-295, 2010.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, 87, 427-444, 2010.

BAO, M.T.; KONG, X.P.; JIANG, G.C.; WANG, X.L.; LI, X.M. Laboratory study on activating indigenous micro-organisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield, **J Petrol Sci Eng**, 66, 42-46, 2009.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc Tecnol Aliment**, 28(4), 979-985, 2008.

BLUTH, M.H.; FU, S.L.; FU, A.; STANEK, A.; SMITH-NOROWITZ, T.A.; WALLNER, S.R.; GROSS, R.A.; NOWAKOWSKI, M.; ZENILMAN, M.E. Sophorolipids decrease asthma severity and ova-specific IgE production in a mouse asthma model. **J Allergy Clin Immun**, 121(2), 52, 2008.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008.

CARRILLO, C.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F. J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochim Biophys Acta**, v. 611, n. 1-2, p. 91-97. 2003.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Int J Eng Sci Techn**, 2(12), 6942-6953, 2010.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **Int J Sci Nature**, 2(1), 63-71, 2011.

CHEN, ML.; PENFOLD, J.; THOMAS, R.K.; SMYTH, T.K.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; STEVENSON, P.; PARRY, A.; TUCKER, I.; GRILLO, I. Mixing behavior of the biosurfactant, rhamnolipid, with a conventional anionic surfactant, sodium dodecyl benzene sulfonate. **Langmuir**, 26(23), 17958-17968, 2010.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *B. circulans*. **J Appl Microbiol**, 104, 1675-1684, 2008.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresour Technol**, 100, 1015-1019, 2009.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **Appl Biochem Biotechnol**, 163, 720-728, 2011a.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production, Characterization, and Properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Appl Biochem Biotechnol**, 158, 663-674, 2009.a

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Res Int**, 42, 499-504, 2009 b.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids Surface B**, 79, 246-253, 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. SUMALATHA, S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Techn Environ Policy**, 13, 481-488, 2011 b.

DARVISHI, P.; AYATOLLAHI, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. **Colloids Surface B**, 84, 292-300, 2011.

FARIA, A.F.; STÉFANI, D.; VAZ, B.G.; SILVA, I.S.; GARCIA, J.S.; EBERLIN, M.N.; GROSSMAN, M.J.; ALVES, O.L.; DURRANT, L.R. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 38, 863-871, 2011.

FELSE, P.A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme Microb Tech**, 40, 316-323, 2007.

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

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; RAIMONDI, C.; BESTETTI, G.; BANAT, I.M.; SMYTH, T.J.; PAPACCHINI, M.; CAVALLO, M.; FRACCHIA, L. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5, **Bioresour Technol**, 108, 245-251, 2012.

FU, S.L.; GARNETT, I.; WALLNER, S.R.; ZENILMAN, M.E. Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. **J Surg Res**, 144(2), 388, 2008.

FUKUOKA, T.; YANAGIHARA, T.; IMURA, T.; MORITA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant,

mannosylerythritol lipid-D and its aqueous phase behavior. **Carbohydr Res**, 346, 266-271, 2011.

FUKUOKA, T.; KAWAMURA M.; MORITA , T.; IMURA , T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma crassa*, produces novel diastereomers of conventional mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants. **Carbohydr Res**, 343, 2947-2955, 2008a.

FUKUOKA, T.; MORITA,T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. **Carbohydr Res**, 343, 555-560, 2008b.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; SHAHRAKI, A.K. Enhanced oil recovery from low permeability dolomite cores using biosurfactant produced by a *Bacillus mojavensis* (PTCC 1696) isolated from Masjed-I Soleyman Field. **J Petrol Sci Eng**, 81, 24-30, 2012.

GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, 25, 441-447, 2012.

GROSS, R. A.; DONCEL, G.; SHAH, V. US Patent. US 10/804778, 2004.

HULTBERG, M.; HOLMKVIST, A.; ALSANIUS, B. Strategies for administration of biosurfactant-producing pseudomonads for biocontrol in closed hydroponic systems. **Crop Protection**, 30, 995-999, 2011.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresour Technol**, 99, 195-199, 2008.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X-Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **J Colloid Interf Sci**, 367, 311-318, 2012b.

KHOPADE, R.; BIAO, X.; LIU, K.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. **Desalination**, 285, 198-204, 2012a.

KIRAN, G.S.; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R.; JOSEPH SELVIN; ANTO THOMAS, T.; RAJEETHA RAVJI, T.; NATARAJASEENIVASANA, K. Optimization and production of a biosurfactant from sponge associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids Surface B**, 73(2), 250-256, 2009.

KOKARE, C.R.; KADAM, S.S.; MAHADIK, K.R.; CHOPADE, B.A. Studies on bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S1, Ind. **J Biotech**. 6 78-84, 2007.

KONISHI, M. FUKUOKA, T.; NAGAHAMA, T.; MORITA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D.; HATADA, Y. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoae* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. **J Biosci Bioeng**, 110(2), 169-175, 2010.

KONISHI, M.; NAGAHAMA, T.; FUKUOKA, T.; MORITA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D.; HATADA, Y. Yeast extract stimulates production of glycolipid

biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62. **J Biosci Bioeng**, 111(6), 702-705, 2011.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARRI, E. M.; MELO, N. K. **Tratado Micol Méd**, 9. ed. São Paulo: Editora Savier, 1104, 2002.

LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A.; STARMER, W.T; SCHLAG-EDLER, B.; BARKER, J.S.F.; BOWLES, J.M. *Wickerhamiella australiensis*, *Wickerhamiella cacticola*, *Wickerhamiella occidentalis*, *Candida drosophilae* and *Candida lipophila*, five new related yeast species from flowers and associated insects. **Int J Syst Bacteriol**, 48, 1431-1443, 1998.

LEE, S.C.; LEE, S.J.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.Y.; CHOI, Y.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. **Bioresour Technol**, 99, 2288-2292, 2008.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, L.Q.; TAKAKI, G.M.C. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Anana comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivados do petróleo. **Exacta**, 8(2), 201-210, 2010.

LIMA, T.M.S.; PROCÓPIO, L.C.; BRANDÃO, F.D.; CARVALHO, A.M.X.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, 22, 585-592, 2011.

LOTFABADA, T.B.; SHOURIANC, M.; REZA, R. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids Surface B**, 11, 3445-3455, 2009.

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

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. **Braz Arch Biol Techn**, 52(4), 785-793, 2009.

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

MANEERAT, S.; PHETRONG, K.; SONG, K. Isolation of biosurfactant: producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. **J Sci Technol**, 29, 781-791, 2007.

MONTEIRO, A.S.; MIRANDA, T.T.; LULA, I.; DENADAIC, A.M.L.; SINISTERRA, R.D.; SANTORO, M.M.; SANTOS, V.L. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids Surface B**, 84, 467-476, 2011.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; YAMAMOTO, S.; KITAGAWA, M.; SOGABE, A.; KITAMOTO, D. Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, 83, 1017-1025, 2009.

MORITA, T.; OGURA, Y.; TAKASHIMA, M.; HIROSE, N.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KONDO, Y.; KITAMOTO, D. Isolation of *Pseudozyma hurashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a

producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **J Biosci Bioeng**, 112(2), 137-144, 2011.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol**, 24, 509-515, 2006.

NAWAWI, W.M.F.W.; JAMAL, P.; ALAM, M.Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresour Technol**, 101, 9241-9247, 2010.

NAKANO, M.; KIHARA, M.; IEHATA, S.; TANAKA, R.; MAEDA, R.; YOSHIKAWA, T. Wax ester-like compounds as biosurfactants produced by *Dietzia maris* from *n*-alkane as a sole carbon source. **J Basic Microb**, 51, 490-498, 2011.

PANILAITIS, B.; CASTRO, G.R.; SOLAIMAN, D.; KAPLAN, D.L. Biosynthesis of emulsion biopolymers from agro-based feedstocks. **J Appl Microbiol**, 102, 531-537, 2007.

PATTANATHU, K.S.M. R.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants. **Biotechnology**, 7, 360-370, 2008.

PEI, X.; ZHAN X.; ZHOU L. Effect of biosurfactant on the sorption of phenanthrene onto original and H₂O₂-treated soils, **J Environ Sci**, 21, 1378-1385, 2009.

PERFUMO, A.; BANAT, I.M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02– 1. **Appl Microbiol Biotechnol**, 72, 132-138, 2006.

PORTILLA-RIVERA, O.; TORRADO, A.; DOMINGUEZ, J.M. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*, 8074-80 ST - Stability and emulsifying capacity. **J Agr Food Chem**, 56(17), 8074-8080, 2008.

PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Res Intern.** 2(4), 284-287, 2009.

REETIKA, G.; KUMAR, U.S.; ASMITA, P. Antibacterial properties of linolenic sophorolipid and its chemically esterified methyl ester form. **Res J Biotech**, 7(3), 40-45, 2012.

ROCHA, M.V.P.; OLIVEIRA, A.H.S.; SOUZA, M.C.M.; GONÇALVES, L.R.B. Natural cashew apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World J Microb Biot**, 22, 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L.R.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. **J Antimicrob Chemoth**, 57(4), 609-618, 2006.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids Surface B**, 84, 1-5, 2011.

SAIMMAI, A.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. **Ann Microbiol.** 62, 391-402, 2012.

SARUBBO, L.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electron J Biotechnol**, 9(4), 2006.

SCHOLZ, C.; MEHTA, S.; BISHT K.; GUILMANOV, V.; LAPLAN, D.; NICOLOSI, R.; GROSS, R. Bioactivity of extracellular glycolipids: investigation of potential anti-cancer activity of sophorolipids and sophorolipid-derivatives. **Proc Am Chem Soc: Polymer Preprints**, 39, 168-169, 1998.

SHALIGRAM, N.S.; SINGHAL, R.S. Surfactin – A Review. **Food Technol Biotechnol**. 48 (2) 119-134, 2010.

SHAVANDIA, M.; MOHEBALIA, G.; HADDADIB, A.; SHAKARAMIA, H.; NUHIC, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids Surface B**, 82, 477-482, 2011.

SHETE, A.M.; WADHAWA, G.; BANAT, I.M.; CHOPADE. B.A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. **J Sci Ind Res India**, 65 (91), 91-115, 2006.

SOBRINHO, H.B.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LEITE, L.F.C.; SARUBBO, L.A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995, **Process Biochem**, 43, 912-917, 2008.

SOTIVORA, A.; SPASOVA, D.; VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D. Effect of rhamnolipid biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Res**, 164(3), 297-303, 2009.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresour Technol**, 102, 3366-3372, 2011.

THAVASI, R.; SUBRAMANYAM, M.N.; JAYALAKSHMI, S.; ALASUBRAMANIAN, T.; IBRAHIM, M.B. Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. **Mar Biotechnol**, 11(5), 551-556, 2009.

VAZ, D.A.; GUDINA, E.J.; ALAMEDA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids Surface B**, 89, 167-174, 2012.

WANG, H.Y.; FAN, B.Q.; LI, C.H.; LIU, S.; LI, M. Effects of rhamnolipid on the cellulase and xylanase in hydrolysis of wheat straw. **Bioresour Technol**, 102, 6515-6521, 2011.

WINTERBURN, J.B.; RUSSELL, A.B.; MARTIN, P.J. Characterization of HFBII biosurfactant production and foam fractionation with and without antifoaming agents. **Appl Microbiol Biotechnol**, 90, 911-920, 2011.

XIA, W.J.; DONG, H.P.; YU, L.; YU, D.F. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. **Colloids Surface A**, 392, 124-130, 2011.

Capítulo II

Revista: Applied Biochemistry and Biotechnology

Fator de Impacto: 1,943

Qualis para Medicina Veterinária: B1

Artigo: Utilização de óleo de soja residual de fritura e água de maceração de milho para a produção de biossurfactante por levedura isolada do pólen apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do Baixo Amazonas.

Mitaliene de Deus S. Silva (a); Ana Paula Santos (a), Polyanna Nunes Herculano (a), Antônio Batista da Silva (b), Leonie Asfora Sarubbo (c), Érika Valente de Medeiros (d), Ana Lúcia Figueiredo Porto (a), Keila Aparecida Moreira (d).

(a) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife/PE.

(b) Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I - Manaus/AM.

(c) Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista – CEP: 50050-900 – Recife/PE.

(d) Unidade Acadêmica de Garanhuns, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista – CEP: 55292-270 – Garanhuns/PE.

Resumo

A produção de biossurfactante foi o fator de seleção entre 20 leveduras isoladas do pólen apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do baixo Amazonas - AM. A produção do biossurfactante pela levedura 9II usando resíduo como fonte de carbono e nitrogênio foi otimizada usando planejamento estatístico Plackett-Burman. O líquido metabólico livre de células apresentou tensão superficial de 28,30 mN/m e rendimento de 5,09 g/L de biossurfactante bruto. A cinética de crescimento e de produção do biossurfactante com a melhor condição de produção estudada, demonstraram que há correlação entre o crescimento da levedura com a produção de biossurfactante. O líquido metabólico apresentou emulsificação de 100% para os óleos de motor virgem e óleo residual de motor. O biossurfactante mostrou-se estável frente à diferentes pHs (2-12), temperaturas (4-120 °C) e concentrações de NaCl (2-12%, p/v) e não apresentou toxicidade frente a sementes de *Lactuca sativa* L., *Brassica oleracea* L. e *Coriandrum sativum* L. e ao microcrustáceo *Artemia salina*.

Palavras-chaves: Biossurfactante, levedura, óleo de soja, milhocina, Plackett-Burman, estabilidade, toxicidade.

Abstract

Biosurfactant production was the selection factor between 20 yeasts isolated from bee pollen of *Melipona seminigra merrillae* of the lower Amazonas - AM. The production of biosurfactant by yeast 9II using waste as a source of carbon and nitrogen was optimized using statistical design Plackett-Burman. The metabolic liquid cell-free presented surface tension 28,30 mN/m, yield of 5,09 g/L of crude biosurfactant. The growth kinetics and production of the

biosurfactant with the best production condition studied demonstrated a correlation between the growth of yeast with the biosurfactant production. The liquid metabolic presented emulsification of 100% for virgin engine oils and residual oil engine. The biosurfactant was stable before a pH range (2-12), temperature (4-120 °C) and NaCl concentrations (2-12%, w/v) and no toxicity compared to *Lactuca sativa* L., *Brassica oleracea* L. and *Coriandrum sativum* L. seeds and *Artemia salina* shrimp.

Keywords: Biosurfactant, yeast, soybean oil, corn steep liquor, Plackett-Burman, stability, toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por micro-organismos. São moléculas anfifílicas que consistem de uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica (1) e podem ser classificados segundo sua composição química, como glicolipídeos, lipopolissacarídeos, oligossacáridos e lipopeptídeos (2, 3). Estas substâncias biológicas são utilizadas em diversas aplicações terapêuticas, como na produção de antibióticos e compostos antifúngicos ou antivirais (4), na biorremediação do solo e areia contaminados como também na recuperação de águas subterrâneas contaminadas por hidrocarbonetos (5).

Comparado com surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam vantagens, pois são biodegradáveis e menos tóxicos (6), assim como, apresentam maior compatibilidade com o ambiente, elevada emulsificação, seletividade específica em extremas condições de temperatura, pH, salinidade, e podem ser sintetizados a partir de reservas renováveis (7). Estas

propriedades os tornam aplicáveis nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas (8).

Embora biossurfactantes apresentem vantagens tão importantes, eles ainda não são utilizados na indústria devido aos elevados custos de produção. Uma possível estratégia para a redução de custos na produção é a utilização de substratos alternativos nos processos (9). A milhocina é obtida através da maceração do milho, apresentando um teor de proteína de 25%, não devendo ser considerada proteína hidrolisada ou hidrolisado protéico e sim como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular (10). O óleo de soja é o de maior consumo no mercado brasileiro, porque os demais óleos vegetais (canola, azeite de oliva, girassol, etc.) apresentam custo superior. Logo, o óleo de soja procedente da fritura de alimentos se apresenta como uma fonte alternativa de carbono de baixo custo e grande disponibilidade em todo o território nacional. Lima et al. (11) utilizaram óleo de soja de fritura como fonte de carbono para a produção de biossurfactante em quantidade superior aos resultados referidos em trabalhos disponíveis na literatura.

Um aspecto importante é encontrar micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes estáveis, para isso, devem-se desenvolver processos eficientes de produção para que se obtenham moléculas ativas utilizando substratos renováveis e resíduos agroindustriais (12).

Desta forma, as leveduras são consideradas boas produtoras de moléculas biotecnologicamente importantes, entretanto, poucas leveduras são descritas na literatura como produtoras de biossurfactantes, sendo as principais representantes as dos gêneros *Candida* e *Pseudozyma* (10, 13, 14). Em virtude

destas questões, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactante por levedura utilizando substrato de baixo custo, assim como avaliar sua cinética de crescimento, emulsificação e toxicidade frente à sementes de alface, repolho e coentro e ao micro crustáceo *Artemia salina*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

As amostras de leveduras utilizadas foram isoladas de pólen apícola da *Melipona seminigra merrillae* coletadas na região do Baixo Amazonas, Boa Vista de Ramos, Amazonas e obtidas da coleção de micro-organismos da Universidade Federal do Amazonas. As 20 culturas de leveduras foram cultivadas em Ágar Sabouraud com extrato de leveduras por 27 °C durante 48h. Posteriormente, uma pequena quantidade de células foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 ml de caldo Sabouraud e incubado aerobicamente durante um 48h a 27 °C em agitador orbital a 150 rpm para obtenção de células para estocagem. Para a obtenção do pré-inóculo, o estoque foi ativado em 100 mL de caldo Sabouraud e incubado em agitador orbital a 27 °C, 150 rpm e 48h.

2.2 Seleção do micro-organismo produtor de biossurfactante

A seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes foi realizada por fermentação submersa, na qual as 20 culturas foram testadas em 100 mL de meio cultivo com a composição: extrato de levedura (10g/L), KH_2PO_4 (3g/L), MgSO_4 (3g/L) e óleo de pequi 0,5%, em pH 7,0 utilizando Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, esterilizadas a 121 °C por 20 min. Foi introduzido uma concentração de 10^8 células/mL do pré-inóculo e foi colocado em agitador

orbital a 150 rpm, 28 °C, por 96h. Inicialmente, a biossíntese do biossurfactante foi avaliada pelo teste de dispersão e agregação de óleo. Posteriormente, as que apresentaram melhores produções foram avaliadas segundo a redução da tensão superficial.

2.3 Teste de dispersão e agregação de óleo

O teste de dispersão e agregação do óleo foi realizado de acordo com Morikawa et al. (15) e modificado por Santos et al. (16) pelo tipo e volume do óleo utilizado. Em uma placa de Petri, foi colocado 40 mL de água ultra pura foi adicionado 2,0 mL do óleo residual de motor. Em seguida 10 µL do líquido metabólico livre de células foram colocados na superfície da película do óleo. A dispersão seguida de agregação do óleo de motor verificada visualmente após 30 segundos.

2.4 Determinação da tensão superficial (TS)

A tensão superficial do líquido livre de células foi realizada utilizando um tensiômetro digital de superfície (KSVSigma 700, Ltd., Finland) pelo método do anel de Du Nuoy (17). A calibração foi realizada utilizando água destilada (TS = 71,5 mN/m \pm 0,5) antes de medir a tensão superficial das amostras.

2.5 Seleção da fonte de carbono de baixo custo na produção de biossurfactante

Após a seleção das culturas produtoras de biossurfactantes, as três melhores foram escolhidas para a seleção da melhor fonte de carbono. Para isto, foram testadas as fontes de carbono de baixo custo: óleo residual de soja, glicerol e melaço. O meio de cultivo foi composto da fonte de carbono (0,5%),

extrato de levedura (10g/L), KH_2PO_4 (3g/L), MgSO_4 (3g/L), com pH 7,0, em Erlenmeyer de 250mL e esterilizadas a 121 °C por 20 min, em duplicata. Foi adicionado 10^8 células/mL do pré-inóculo e foi colocado em agitador orbital a 150 rpm, 28 °C, por 96h. A eficiência na produção do biossurfactante foi avaliada pela medida da redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células.

2.6 Otimização da produção de biossurfactante através do modelo Plackett–Burman

Após a seleção da melhor cultura de levedura e da melhor fonte de carbono de baixo custo, o planejamento fatorial Plackett-Burman, foi analisado com a ajuda do software estatístico Statistica 8.0, foi realizado a fim de determinar a melhor condição de produção de biossurfactante, usando substrato de baixo custo composto por milhocina e óleo de soja residual de fritura. Os intervalos e níveis de variáveis investigadas no presente estudo estão apresentados na Tabela 1. A biossíntese foi avaliada segundo tensão superficial e índice de emulsificação com diversos óleos. O modelo Plackett-Burman é adequado para a investigação dos efeitos de um grande número de parâmetros de um ensaio experimental e podem ser utilizados para determinar os fatores que têm contribuições significativas (18), e é baseado no modelo de equação de primeira ordem:

$$Y = b_0 + b_i x_i$$

Onde, Y é a resposta, b_0 é o modelo intercepto, b_i é o coeficiente linear e x_i é o nível da variável independente.

2.7 Índice de emulsificação (IE₂₄)

O IE₂₄ foi medido utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (19) modificado, no qual 1mL do líquido metabólico livre de células foi adicionado a 1mL de diferentes óleo sem tubo de ensaio com tampa e agitadas vigorosamente por 2 min, em triplicata. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24h, a 28 °C. O IE₂₄ foi calculado dividindo-se a altura da camada de emulsão pela altura total da mistura e multiplicada por 100.

2.8 Cinética de crescimento e produção de biossurfactante

A curva de crescimento e produção do biossurfactante foi alcançada com as amostras colhidas a cada 6 h durante as primeiras 24 horas e a cada 12 h, até o término do período de fermentação (120 h) e acompanhadas de análises de biomassa (peso seco em g/L), pH, tensão superficial, rendimento em biossurfactante isolado (g/L) e IE₂₄ com óleo de soja. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.9 Determinação da estabilidade do biossurfactante

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada utilizando o líquido metabólico livre de células obtido por centrifugação das culturas a 8000 rpm durante 10 min. As amostras foram mantidas a temperaturas de 4, 28,60, 80, 100 e 121 °C a 10 min e a tensão superficial foi mensurada logo após a temperatura ambiente. No estudo da estabilidade do líquido metabólico livre de células em diferentes valores de pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0). Também foi observado o efeito das concentrações de NaCl no intervalo de 2, 4, 6, 8, e 10% (p/v). Em todos os ensaios foram determinados a tensão superficial, em duplicata.

2.10 Extração e rendimento do biossurfactante bruto

O líquido metabólico livre de células foi filtrado e centrifugado a 8000 rpm durante 20 minutos. Proporções de clorofórmio:metanol (1:1) foram utilizadas para a extração utilizando funil de separação, a 28 °C. A suspensão foi depositada em placas de Petri esterilizadas e evaporada em estufa a 37 °C por 24h, até peso constante. O biossurfactante seco foi retirado da placa e macerado até obter um pó. O rendimento do biossurfactante bruto foi medido em g/L.

2.11 Atividade de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante bruto foi determinada de acordo com Tiquia et al. (20). As sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), repolho (*Brassica oleracea* L.) e coentro (*Coriandrum sativum* L.) foram adicionadas em soluções do biossurfactante bruto nas concentrações de 1, 5 e 50 mg/mL. A determinação da fitotoxicidade foi avaliada após 120 h, e expressa pelo índice de germinação (IG), através das percentagens de germinação relativa das sementes (GRS) e de comprimento relativo das raízes (CRR):

$$GRS (\%) = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas no extrato}}{\text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas no controle}} \right) \times 100$$

$$CRR (\%) = \left(\frac{\text{comprimento médio da raiz no extrato}}{\text{comprimento médio da raiz no controle}} \right) \times 100$$

$$IG (\%) = (GRS \times CRR) \div 100$$

2.12 Atividade de toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade foi realizado segundo Meyer et al. (21) utilizando *Artemia salina*, um micro crustáceo indicador de toxicidade. Os ovos de *A. salina* foram colocados em uma solução de sal marinho (30g/L) e incubados com luz artificial por 24h para eclosão das larvas.

Após eclosão, 10 larvas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução salina com as seguintes concentrações do biossurfactante: 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 g/L. O controle foi realizado apenas com a solução salina e as larvas. As amostras foram observadas após 24 h, para o cálculo da taxa de mortalidade. A concentração limiar de toxicidade, expressa como concentração de biossurfactante por 100 mL de água salina, foi definida como a menor concentração letal aos micros crustáceos em 24 h. Os testes foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Seleção do micro-organismo com potencial produção de biossurfactante e da fonte de carbono

A partir da seleção das 20 culturas de leveduras isoladas do pólen apícola, 13 apresentaram potencial para produção de biossurfactantes com melhor dispersão e agregação do óleo de motor residual. Quando mensuradas a redução da tensão superficial, destacaram-se as leveduras 7II, 9II e 10II, como mostradas na Tabela 2.

Um grande desafio para a produção de biossurfactante é a redução dos custos. Estima-se, então, que a escolha de uma fonte de carbono de baixo

custo ou residual, atenuado de 10-30% do custo total da produção (10). O óleo de pequi, utilizado para produção de biossurfactantes com baixa tensão superficial, apresenta custo elevado sendo necessário encontrar uma fonte de carbono de baixo custo. A Figura 1 mostra a seleção da fonte de carbono, na qual se observou que o óleo de soja residual de fritura foi a matéria-prima que apresentou melhores reduções de tensão superficial para as leveduras estudadas. O líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido pela levedura 9II apresentou os menores valores de tensão superficial de $31,931 \pm 0,194$ mN/m, sendo esta a levedura escolhida para fases posteriores neste trabalho. O óleo de soja residual também foi a fonte de carbono escolhida para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* (8) por *C. tropicalis* UCP0996; *C. lipolytica* UCP0988; *C. sphaerica* UCP0995; *C. glabrata* UCP1002; *C. buinensis* UCP0994 e *C. guilliermondii* UCP0992 (22).

3.2 Otimização da produção de biossurfactante

A levedura 9II selecionada foi cultivada em meios de produção com diferentes condições. A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento do modelo estatístico Plackett-Burman com a resposta estudada em tensão superficial, uma vez que ela é um parâmetro primário para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes. A tensão superficial do líquido metabólico livre de células de 54,78 mN/m foi reduzida para 28,31 mN/m no ensaio 9, quando cultivado sob 2,0% de óleo de soja residual, 0,15% de milhocina, 0,4% de ureia, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 8, 28 °C, 96h, agitação de 100 rpm, aeração de 20%, e 10^8 colônias/mL do pré-inóculo. O planejamento Plackett-Burman foi também usado para otimizar a produção de biossurfactante pela bactéria S02, obtendo uma tensão superficial

de 36,2mN/m, apresentando como variáveis as concentrações de sacarose, glucose, NaNO_3 , FeSO_4 , MgSO_4 e K_2HPO_4 como sendo importantes parâmetros na produção do biossurfactante (23).

Os valores dos efeitos de cada variável com resposta em tensão superficial estão descritos na Tabela 4. A análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada com as variáveis independentes, mostrada na Tabela 5, apresenta os resultados estatísticos para a determinação da relação entre as variáveis significantes e a resposta. Os fatores a um nível de 95% ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. O maior valor de F indica que a variável explicou adequadamente a variação dos dados sobre a sua média e as estimativas dos efeitos das variáveis foram reais.

Comparando as Tabelas 4 e 5, podemos observar que as variáveis independentes que apresentaram efeitos significativos foram concentração de óleo de soja residual, concentração de milhocina e temperatura de incubação. O óleo de soja e a temperatura tiveram efeitos positivos, o que indica a redução da tensão superficial dependerá de menores valores dessas variáveis. Já a concentração de milhocina deve ser maior para menores tensões superficiais, pois obteve um efeito negativo.

Além da tensão superficial, outras respostas também foram verificadas no planejamento Plackett-Burman, como apresentada na Tabela 6. Verifica-se que a diminuição da tensão superficial não está diretamente relacionada com o aumento da biomassa diante das diferentes condições de produção avaliadas no planejamento. Esses dados corroboram aos apresentados por Amézcua-Vega et al. (24) que também não encontraram correlação entre esses dois

fatores na produção de biossurfactante por *C. ingens* e enquanto que Nawawi et al. (23) que encontrou uma correlação crescente entre biomassa e tensão superficial no estudo com bactérias isoladas de hidrocarbonetos.

Os experimentos com tensão superficial próximos ou inferiores a 30 mN/m (valor considerado de um bom biossurfactante) apresentaram boa emulsificação dos óleos testados, com destaque para o ensaio 9 que apresentou maior El_{24} o óleo de soja (38,29%) e para o ensaio 8 com maior El_{24} com os óleos de milho (31,37%) e de motor residual (95,91%).

3.3 Cinética de crescimento da levedura e de produção do biossurfactante

A cinética de crescimento e produção de biossurfactante pela levedura 9II (Figura 2) foi realizada segundo as condições de crescimento já estabelecida segundo o ensaio 9, que compreende 2,0% de óleo de soja residual, 0,15% de milhocina, 0,4% de uréia, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 8, 28 °C, agitação de 100 rpm, 20% de aeração e 10^8 células/mL do pré-inóculo.

As curvas da cinética apresentaram uma correlação entre o crescimento da biomassa e a produção do biossurfactante, a tensão superficial e emulsificação, sugerindo um crescimento do micro-organismo associado a esses fatores. A biomassa foi crescente e se tornando estável a partir das 84h de crescimento, com valor máximo de 5,8 g/L. O rendimento maior de 4,93 g/L ocorreu as 96h de produção, que foi inferior ao encontrado por Sobrinho et al. (25) no estudo da cinética de crescimento por *C. sphaerica* produzida com resíduo de óleo de amendoim e milhocina que alcançou rendimento de 4,5 g/L, com 144h de produção.

O pH diminuiu para 6,9 nas 12 primeiras horas provavelmente devido à produção de metabólicos primários, depois aumentou e se manteve em torno de 7,9. Essa característica da diminuição do pH nas primeiras horas de produção e com posterior aumento aumentar também foi verificada por Silva, et al. (26) na curva de crescimento de 120 h por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992.

A tensão superficial do líquido metabólico foi diminuindo (42,13 até 28,13 mN/m) se tornando estável com 96h de biossíntese. Neste ponto também iniciou a estabilidade da emulsificação do óleo de soja com o maior IE₂₄ de 50,1% registrado com 108h.

3.4 Índice de emulsificação

O estudo da emulsificação do líquido metabólico livre de células produzido pela levedura 9II contra uma gama de óleos e querosene é apresentado na Figura 3. O biossurfactante apresentou capacidade de emulsionar todas as substâncias utilizadas, com resultado mais evidenciado para os óleos de motor e de motor residual, ambos com IE₂₄ de 100%.

O IE₂₄ corroborou aos valores encontrados pela produção de biossurfactante por diferentes espécies de *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. buinensis* e *C. glabrata*) também apresentou 100% de emulsificação para o óleo de motor (22). O EI₂₄ foi também relevante com *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794 com n-hexadecano, n-octadecano, dodecano, parafina, tolueno, óleo de oliva e de rícino (27).

3.5 Estabilidade do biossurfactante

Nos experimentos realizados com o biossurfactante produzido pela levedura 9II em relação à variação da temperatura (Figura 4a), demonstrou uma relativa estabilidade da tensão superficial diante da faixa estudada (4 a 120 °C). Esses dados corroboram ao resultado obtido pelo biossurfactante produzido por *C. glabrata* UCP 1002 (28), que obteve estabilidade da tensão superficial com temperaturas entre 4-80 °C.

A tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante mostrou-se estável, independente da concentração de sal adicionada (Figura 4b) o que difere do biossurfactante produzido por *C. tropicalis* que tolerada cloreto de sódio a 5% e perde 20% da sua atividade com a adição de do sal a 10% (29).

Houve a estabilidade da tensão superficial do biossurfactante produzido pela levedura 9II submetido a pHs de 2 a 10 (Figura 4c). Esta estabilidade está de acordo com estudos do biossurfactante produzido *C. sphaerica*, que manteve a estabilidade do EI₂₄ de 100% com óleo de motor diante de uma gama de valores de pHs (30).

3.6 Toxicidade do biossurfactante

Para a avaliação da fitotoxicidade, considera-se que um IG maior que 80% é indicador de fitotoxicidade negativa (20). Os resultados apresentados na Figura 5 indicaram que as soluções do biossurfactante produzido pela levedura 9II testada não mostraram efeitos inibitórios na germinação e alongamento das raízes das sementes de alface, repolho e coentro. A ausência de toxicidade também foi encontrada por Luna et al. (31) do biossurfactante produzido por *C.*

sphaerica UCP0995 frente a sementes de repolho, alface, couve e jiló. Silva et al. (26) também observaram fitotoxicidade negativa para repolho, do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 apresentando o menor IG de 86% para uma concentração de 700 mg/L.

O biossurfactante produzido pela levedura 9II não apresentou toxicidade ao micro crustáceo *A. salina*, não sendo letal nas concentrações testadas. Corroborando com esse resultado, o biossurfactante produzido por *C. sphaerica* UCP0995 não apresentou letalidade à *A. salina* nas concentrações de 0,125; 0,25 e 0,50 g/L (31). Estudos realizados por Silva et al. (26) encontrou letalidade de 50% para o biotensoativo produzido por *P. aeruginosa* UCP0992 nas concentrações de 0,700 e 0,525 g/L.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que leveduras isoladas do pólen apícola de *M. seminigra merrillae* proveniente da região do baixo Amazonas - AM produzem biossurfactante com baixa tensão superficial, utilizando como substrato de baixo custo, resíduos da indústria de milho e de óleo de fritura. A levedura 9II apresenta crescimento associado com a produção de biossurfactante. Esse biossurfactante apresentou emulsificação a diversos óleos, é estável em diferentes variações de temperatura, concentração de NaCl e pH como também não é tóxico á sementes de sementes de *Lactuca sativa* L., *Brassica oleracea* L. e *Coriandrum sativum* L. e ao micro crustáceo *A. salina*. Estas características indicam potencialidade de aplicação deste biossurfactante em diversos ramos industriais.

REFERÊNCIAS

1. Luna, J.M.; Sarubbo, L.; Campos-Takaki, G.M. (2009) *Braz Arch Biol Techn*, 52, 785-793.
2. Franzetti, A.; Tamburini, E.; Banat, I.M. (2010) *Adv Exp Med Biol.*, 672, 121–134, 2010.
3. Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.G.; Fracchia, L.; Smyth, T.J.; Marchant, R. (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 427–444.
4. Monteiro, A.S.; Coutinho, J.O.P.A.; Júnior, A.C.; Rosa, C.A.; Siqueira, E.P.; Santos, V.L. (2009) *J Basic Microb*, 49, 553–563.
5. Lima, C.; Ribeiro, E.; Sérvulo, E.; Resende, M.; Cardoso, V. (2009) *Appl Biochem and Biotechnol*, 152, 156-168.
6. Zhao, Z.; Selvam, A.; Wong, J.W.C. (2011) *J Hazard Mater*, 190, 345–350.
7. Khopade, A.; Ren, B.; Liu, X-Y.; Mahadik, K.; Zhang, L.; Kokare, C. (2012) *J Colloid Interf Sci*, 367, 311–318.
8. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A.; Rodrigues, L.R.M.; Teixeira, J.A.C.; Campos-Takaki, G.M. (2011) *Colloids Surface B*, 84, 1–5.
9. Thavasi, R.; Jayalakshmi, S.; Banat, I.M. (2011) *Bioresour. Technol.*, 102, 3366–3372.
10. Fontes, G.C.; Amaral, P.F.F.; Coelho, M.A.Z. (2008) *Quím Nova*, 31, 2091-2099.
11. Lima, A.S.; Alegre, R.M. (2009) *Braz Arch Biol Techn*, 52, 285-290.

12. Monteiro, A.S.; Miranda, T.T.; Lula, I.; Denadai, A.M.L.; Sinisterra, R.D.; Santoro, M.M.; Santos, V.L. (2011) *Colloids Surface B*, 84, 467–476.
13. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. (2008). *Exacta*, 6, 209-215.
14. Fukuoka, T.; Yanagihara, T.; Imura, T.; Morita, T.; Sakai, H.; Abe, M.; Kitamoto, D. (2011) *Carbohydr Res*, 346, 266–271.
15. Morikawa, M.; Daido, H.; Takao, T.; Murata, S.; Shimonishi, Y.; Imanaka, T. *J Bacteriol.*, 175, 6459-6466.
16. Santos, E.F.; Sarubbo, L.A.; Porto, A.L. (2012) Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.
18. Plackett, R.L., Burman, J.P. (1946). *Biometrika*, 33, 305–325.
17. Bodour, A.A.; Miller-Maier, R.M. (1998) *J. Microbiol. Methods.*, 32, 273–280.
19. Cooper, D.G.; Goldenberg, B.G. (1987) *Appl Environ Microbiol*, 53, 224-229.
20. Tiquia, S.M.; Tam, N.F.Y.; Hodgkiss, I.J. (1996) *Environ. Pollut.*, 93, 249.
21. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.B.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. (1982) *Planta Med.*, 45, 31-34.
22. Coimbra, C.D.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. (2009) *Curr. Microbiol.*, 58, 245–251.
23. Nawawi, W.M.F.W.; Jamal, P.; Alam, M.Z. (2010) *Bioresour. Technol.*, 101, 9241–9247.

24. Amézcuca-Vega, C.; Poggi-Varaldo, H.M.; Esparza-García, F.; Ríos-Leal, E.; Rodríguez-Vázquez. (2007) *Bioresour. Technol.*, 98, 237–240.
25. Sobrinho, H.B.S.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Salgueiro, A.A.; Campos-Takaki, G.M.; Leite, L.F.C.; Sarubbo, L.A. (2008) *Process Biochem.*, 43, 912–917.
26. Silva, S.N.R.L.; Farias, C.B.B.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. (2010) *Colloid Surface B*, 79,174–183.
27. Pal, M.P.; Vaidya, B.K.; Desai, K.M.; Joshi, R.M.; Nene, S.N.; Kulkarni, B.D. (2009) *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 747–756.
28. Luna J.M.; Sarubbo, L.; Campos-Takaki, G.M. (2009) *Braz Arch Biol Techn*, 52, 785-793.
29. Muthusamy, K.; Gopalakrishnan, S.; Ravi, T.K.; Sivachidambaram, P. (2008) *Curr Sci.*, 94, 736–747.
30. Luna, J. M.; Rufino, R.D.; Campos-Takaki, G.M.; Sarubbo, L.A. (2012) *Chem Eng Transactions*, 27.
31. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. (2013) *Colloids Surface B*, 102, 202– 209.

Tabelas

Tabela 1. Nível de cada variável do modelo de planejamento estatístico Plackett-Burman para a avaliação da produção de biossurfactante por levedura isolada de pólen apícola de *M. seminigra merrillae* da região do Baixo Amazonas, Brasil.

Variáveis	Menor nível (-)	Maior nível(+)
A - Óleo de soja residual de fritura (%)	0,5	2,0
B - Milhocina (%)	0,15	2,0
C - Ureia (%)	0,1	0,4
D - KH ₂ PO ₄ (%)	0,03	0,1
E - MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	0,02	0,04
F – pH	6,0	8,0
G - Temperatura (°C)	28	34
H - Tempo (horas)	96	144
I - Agitação(rpm)	100	200
J - Aeração* (%)	20	40
L - Tamanho do Inóculo (células/mL)	10 ⁵	10 ⁸

*Razão entre a quantidade de meio/capacidade do Erlenmeyer

Tabela 2. Medidas da redução da tensão superficial da seleção de leveduras isoladas do pólen apícola recolhido na região do Baixo Amazonas segundo a capacidade de produção de biossurfactantes.

Levedura	Tensão Superficial
1I	$37,05 \pm 0,07$
2I	$40,08 \pm 0,12$
3I	$41,65 \pm 0,71$
4I	$43,01 \pm 0,30$
5I	$40,31 \pm 0,37$
6I	$44,16 \pm 0,20$
4II	$44,72 \pm 0,25$
5II	$41,64 \pm 0,41$
6II	$43,94 \pm 0,43$
7II	$35,27 \pm 0,21$
9II	$34,37 \pm 0,36$
10II	$32,00 \pm 0,23$
13II	$37,29 \pm 0,19$

Tabela 3. Matriz do planejamento das variáveis do modelo Plackett-Burman e respostas em tensão superficial do líquido metabólico da produção de biossurfactante pela levedura 9 II.

Óleo de soja residual (%)	Milhocina (%)	Uréia (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	MgSO ₄ (%)	pH	Tempe- ratura (°C)	Tempo (h)	Agitação (RPM)	Aeração (%)	Tamanho do inóculo (células/mL)	Tensão superficial (mN/m)
0,5 (+)	2,0 (+)	0,1 (-)	0,10 (+)	0,02 (-)	6 (-)	28 (-)	144 (+)	200 (+)	40 (+)	10*5 (-)	36,90
2,0 (-)	2,0 (+)	0,1 (-)	0,10 (+)	0,04 (+)	6 (-)	34 (+)	96 (-)	100 (-)	20 (-)	10*8 (+)	37,90
0,5 (+)	2,0 (+)	0,4 (+)	0,03 (-)	0,04 (+)	6 (-)	28 (-)	96 (-)	200 (+)	40 (+)	10*8 (+)	35,15
0,5 (+)	0,15 (-)	0,4 (+)	0,10 (+)	0,04 (+)	6 (-)	34 (+)	144 (+)	100 (-)	40 (+)	10*5 (-)	38,64
2,0 (-)	2,0 (+)	0,4 (+)	0,03 (-)	0,04 (+)	8 (+)	28 (-)	144 (+)	100 (-)	20 (-)	10*5 (-)	42,93
0,5 (+)	0,15 (-)	0,1 (-)	0,03 (-)	0,02 (-)	6 (-)	28 (-)	96 (-)	100 (-)	20 (-)	10*5 (-)	28,62
2,0 (-)	0,15 (-)	0,4 (+)	0,03 (-)	0,02 (-)	6 (-)	34 (+)	144 (+)	200 (+)	20 (-)	10*8 (+)	38,21
0,5 (+)	0,15 (-)	0,1 (-)	0,10 (+)	0,04 (+)	8 (+)	28 (-)	144 (+)	200 (+)	20 (-)	10*8 (+)	30,89
2,0 (-)	0,15 (-)	0,4 (+)	0,10 (+)	0,02 (-)	8 (+)	28 (-)	96 (-)	100 (-)	40 (+)	10*8 (+)	28,30
0,5 (+)	2,0 (+)	0,4 (+)	0,10 (+)	0,02 (-)	8 (+)	34 (+)	96 (-)	200 (+)	20 (-)	10*5 (-)	44,36
0,5 (+)	2,0 (+)	0,1 (-)	0,03 (-)	0,02 (-)	8 (+)	34 (+)	144 (+)	100 (-)	40 (+)	10*8 (+)	41,19
2,0 (-)	0,15 (-)	0,1 (-)	0,03 (-)	0,04 (+)	8 (+)	34 (+)	96 (-)	200 (+)	40 (+)	10*5 (-)	39,52

Tabela 4. Resultado dos efeitos das variáveis segundo o modelo Plackett-Burman para avaliação da produção de biossurfactante pela levedura 9II.

	Efeito	Coeficiente
Média	43,2730	43,27300
Óleo de soja residual	13,5960*	6,79800
Milhocina	-18,4960*	-9,24800
Uréia	-10,6860	-5,34300
KH ₂ PO ₄	-11,3493	-5,67467
MgSO ₄ .7H ₂ O	9,4907	4,74533
pH	-10,8227	-5,41133
Temperatura	14,4173*	7,20867
Tempo	5,7640	2,88200
Agitação	7,0140	3,50700
Aeração	8,7873	4,39367
Tamanho do inóculo	5,0307	2,51533

*Efeitos estatisticamente significativos a um nível de 95% de confiança.

Tabela 5. Análise de variância para as variáveis significativas das condições de produção de biossurfactante pela levedura 9II.

	SQ*	gl*	MQ*	Valor de F	Valor de p
1- Óleo de soja residual	680,216	1	680,216	272,7094	0,00079
2 - Milhocina	1562,189	1	1562,189	626,3068	0,00015
3 - Temperatura	989,629	1	989,629	396,7581	0,00037
Interação 1 com 2	734,273	1	734,273	294,3820	0,00068
Interação 1 com 3	467,902	1	467,902	187,5893	0,00165
Interação 2 com 3	236,073	1	236,073	94,6453	0,00625
Erro Puro	9,977	4	2,494		
Total SS	4082,914	11			

*SQ = Soma Quadrática; gl = grau de liberdade; MQ = Média Quadrática.

Tabela 6. Variáveis resposta do modelo estatístico Plackett-Burman para otimização da produção de biossurfactante pela levedura 9II.

Ensaio	Biomassa (g/l)	TS* (mN/m)	EI ₂₄ (%)				
			OG	OMI	OS	OMR	OMO
1	4,18	36,90	29,16	29,68	13,41	80,88	40,90
2	3,80	37,90	21,21	26,36	34,74	61,14	49,90
3	6,08	35,15	42,64	28,56	35,89	89,78	57,19
4	2,12	38,64	11,76	29,41	34,28	86,11	94,12
5	2,06	42,93	26,14	27,94	27,52	81,43	50,01
6	1,25	28,62	29,86	26,18	30,30	93,94	94,20
7	3,04	38,20	18,35	26,70	26,05	82,21	90,81
8	2,26	30,89	37,09	31,37	35,24	95,58	95,91
9	3,56	28,31	26,40	30,36	38,29	89,36	92,72
10	4,61	44,36	39,24	22,03	35,30	35,30	44,44
11	5,26	41,19	25,53	28,24	24,43	52,78	50,48
12	4,30	39,50	34,31	29,11	30,71	83,53	93,49

* Tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE₂₄), óleo de girassol (OG), óleo milho (OM), óleo soja (OS), óleo motor residual (OMR), óleo motor (OMO).

Figuras

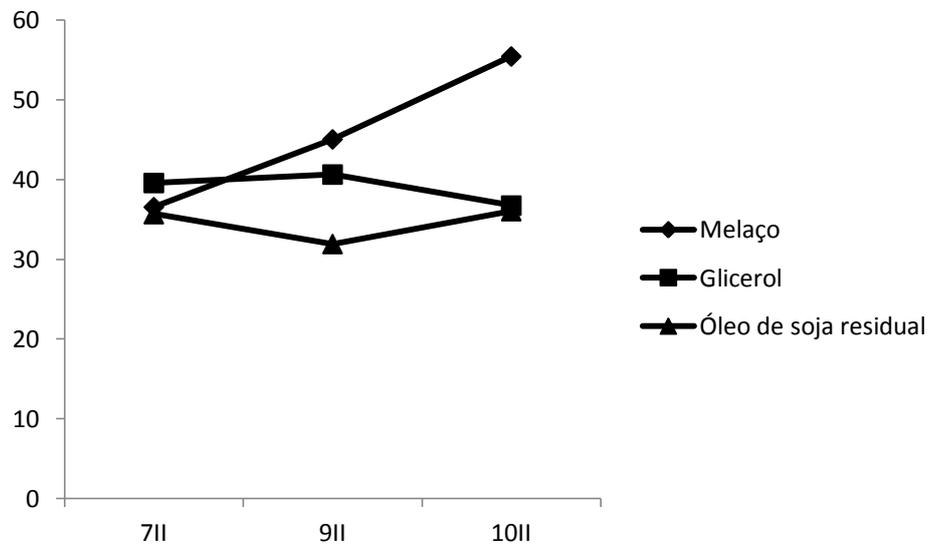


Figura 1. Seleção da melhor fonte de carbono (—◆— Melaço, —■— Glicerol e —▲— Óleo de soja residual) de baixo custo na produção de biossurfactantes das leveduras 7II, 9II e 10II pela redução da tensão superficial

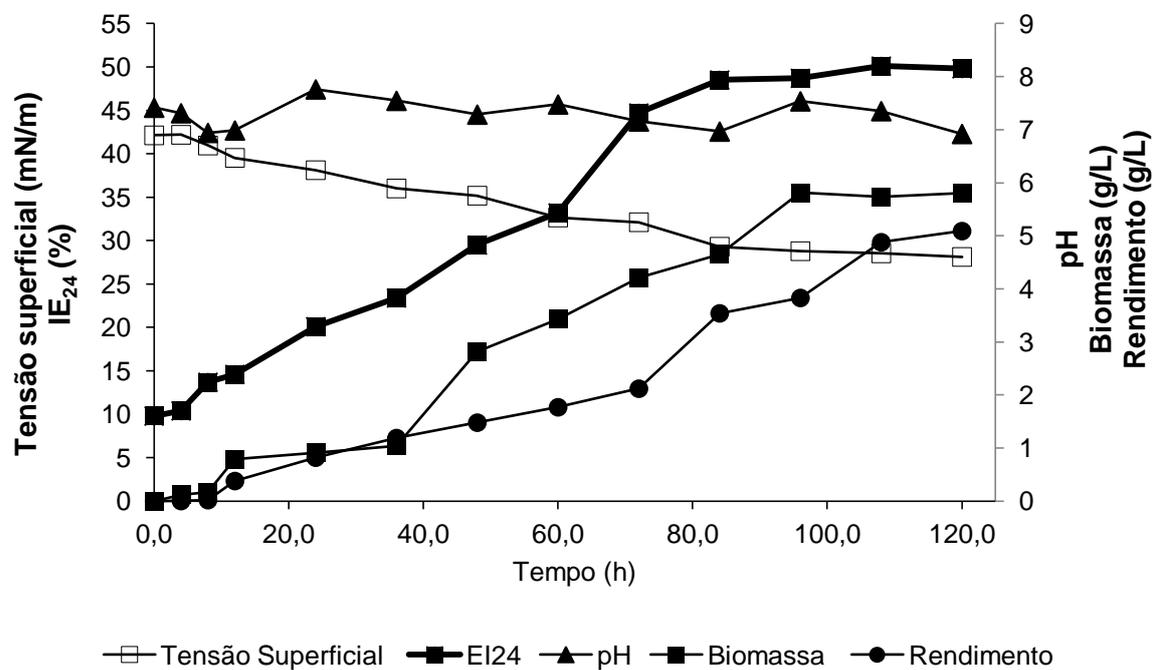


Figura 2. Curva de crescimento da produção de biosurfactante por levedura isolada de pólen apícola de *M. seminigra merrilae*

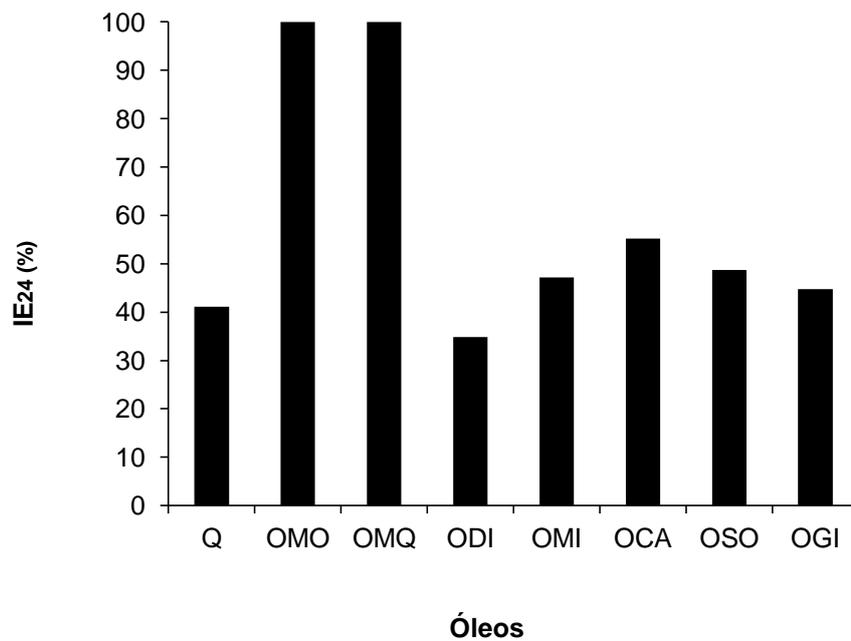


Figura 3. Índice de emulsificação (IE₂₄) do biossurfactante produzido por levedura isolada do pólen apícola diante do querosene (Q) e os óleos de motor (OMO), de motor queimado (OMQ), diesel (ODI), de milho (OMI), de canola (OCA), de soja (OSO) e de girassol (OGI)

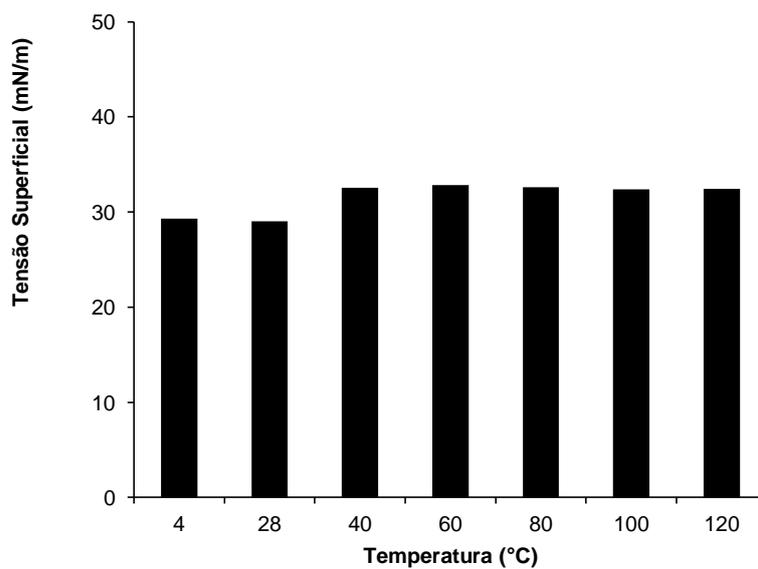


Figura 4a. Estudo da estabilidade do líquido metabólico livre de células do biosurfactante produzido pela levedura 9II em diferentes valores de temperatura através da redução de tensão superficial

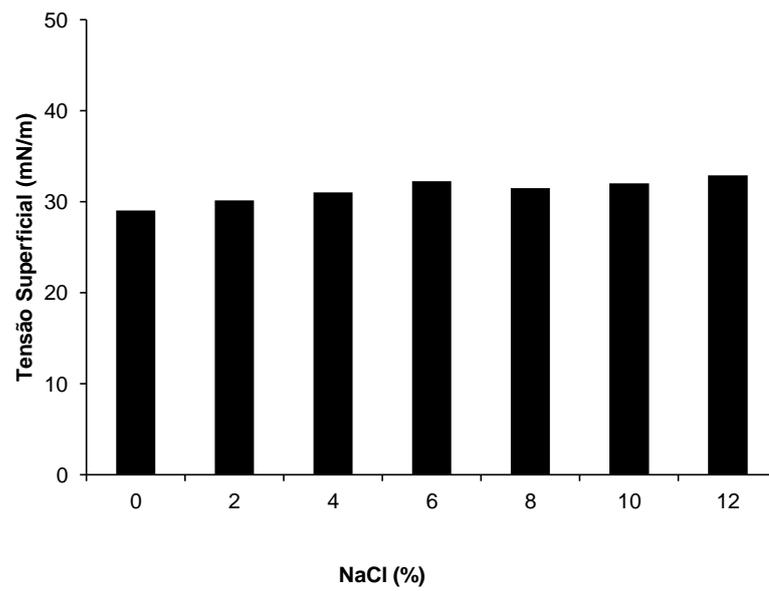


Figura 4b. Estudo da estabilidade do líquido metabólico livre de células do biossurfactante produzido pela levedura 9II em diferentes valores de NaCl através da redução de tensão superficial

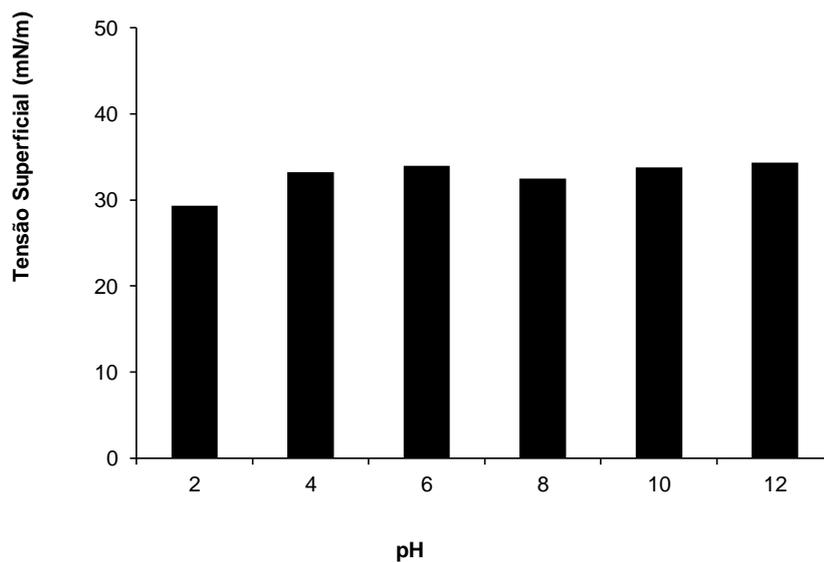


Figura 4c. Estudo da estabilidade do líquido metabólico livre de células do biosurfactante produzido pela levedura 9II em diferentes valores de pHs através da redução de tensão superficial

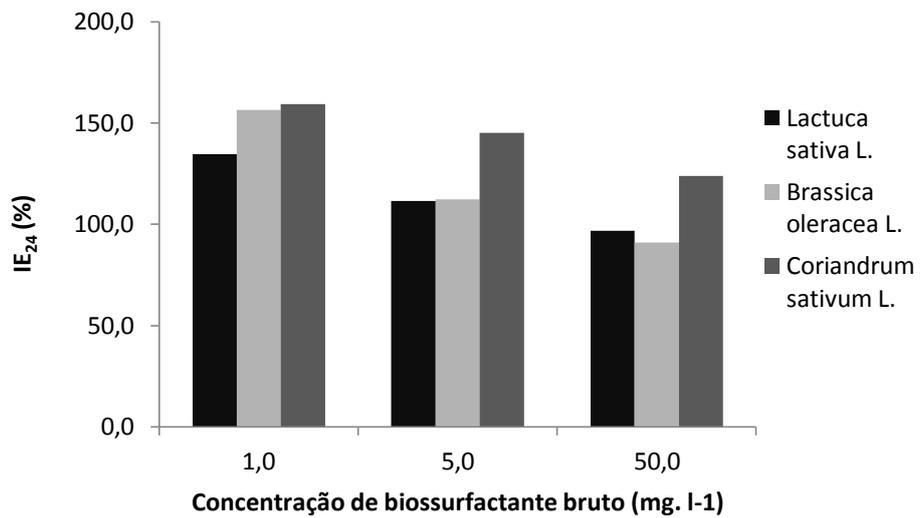


Figura 5. Teste de fitotoxicidade pelo índice de germinação (IG) do biossurfactante isolado produzido pela levedura 9II isolada de pólen apícola frente a sementes de *Lactuca sativa* L., *Brassica oleracea* L. e *Coriandrum sativum* L.