

ANDREA DE SOUZA MONTEIRO

TESE DE DOUTORADO

PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES POR
LEVEDURAS ISOLADAS DE EFLUENTES DE UMA
INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

UFMG
2009

Andrea de Souza Monteiro

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES POR
LEVEDURAS ISOLADAS DE EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA DE
LATICÍNIOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em
Ciências Biológicas: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Ary Corrêa Jr.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2009

Andrea de Souza Monteiro

PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES POR
LEVEDURAS ISOLADAS DE EFLUENTES DE UMA
INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

Belo Horizonte

2009

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr Ary Corrêa Jr., pela orientação paciente e dedicada, por seu apoio e pelos conselhos valiosos que contribuíram para realização deste trabalho;

À Professora Dra. Vera Lúcia dos Santos, pelo carinho, amizade, dedicação e pelos conselhos que contribuíram de maneira significativa para realização deste trabalho e para a minha formação pessoal e acadêmica;

Ao programa de Pós-Graduação em microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerias, pela grande oportunidade de aprendizado e formação;

Ao CNPq pela bolsa concedida, à FAPEMIG, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho;

À todos os professores do Departamento de Microbiologia do ICB pela contribuição na minha formação e pelos ensinamentos prestados durante o curso, e a todos os colegas do Departamento, pela ajuda nos momentos de necessidade;

Ao Dr. Carlos Zani e ao Dr. Ezequias Siqueira, pela valiosa ajuda e por disponibilizar o laboratório para realização das análises;

Ao Professor Marcelo Matos Santoro, pela disponibilidade em ajudar na revisão dos textos.

Ao Professor Carlos Augusto Rosa, pela ajuda na identificação das leveduras e por

disponibilizar os equipamentos do laboratório;

Aos queridos amigos do Laboratório Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas, Leonardo Rodrigues e Tatiana Miranda, pela convivência tão agradável e pela enorme ajuda que sempre me ofereceram;

Aos membros da Banca Examinadora deste trabalho, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que certamente serão muito importantes para a melhoria e continuidade dos nossos estudos;

A todos os colegas do Laboratório Microbiologia aplicada, pelo auxílio prestado no decorrer deste trabalho;

Ao estagiário Vitor Dominguez de Souza, pela paciência, dedicação e tranqüilidade na condução trabalho;

À Dra. Maria Rosa Quaresma, pela ajuda inestimável e pela dedicação durante a realização deste trabalho;

À minha querida mãe Terezinha de Souza Monteiro e ao meu pai Joaquim Inácio Monteiro que não está mais entre nós pelo amor, carinho e incentivo durante esta jornada;

Aos meus irmãos Wanderson de Souza Monteiro, Adenilson, de Souza, Jéssica de Souza e Gleiciane de Souza Pereira, a minha sobrinha Karollayne Vitória de Souza Monteiro, pelo companheirismo e amizade;

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Biossurfactantes	18
2.2 Avaliação da atividade biossurfactante	19
2.3 Produção de biossurfactantes por leveduras e fungos filamentosos	21
2.4 Condições para a produção de biossurfactantes	23
2.5 Funções fisiológicas dos biossurfactantes	24
2.6 Aplicações dos biossurfactantes na inibição de adesão e crescimento de micro-organismos	26
2.7 Efeitos na biodegradação e remoção de compostos hidrofóbicos	29
2.8 Utilização de biossurfactantes na indústria	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Isolamento das leveduras	33
4.2 Detecção da atividade emulsificante produzida pelos isolados	34
4.2.1 Crescimento dos isolados	34
4.2.2 Método da atividade emulsificante	34
4.3 Identificação das leveduras	35
4.3.1 Extração do DNA das leveduras	35
4.3.2 Amplificação da região D1/D2 do rDNA 26S e da região ITS1-ITS2 do rDNA	36
4.4 Extração de compostos surfactantes e emulsificantes da cultura livre de células	38

4.4.1 Crescimento e obtenção da cultura livre de células	38
4.4.2 Determinação da tensão superficial do meio livre de células.....	38
4.4.3 Extração de compostos tensoativos.....	39
4.4.4 Determinação da atividade emulsificante e atividade surfactante.....	39
4.4.5 Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes	40
4.5. Purificação e caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelos isolados CLV 20, CLOA 40, CLOA 70 e CLOA 72.....	40
4.5.1 Purificação parcial do biossurfactante por cromatografia de gel filtração	40
4.5.2 Caracterização dos ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa	41
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	42
4.6 Cinética de crescimento e produção dos biossurfactantes pelos isolados CLV 20, CLOA 40, CLOA 70 e CLOA 72.....	43
4.7 Determinação da hidrofobicidade celular dos isolados CLV 20, CLOA 40, CLOA 70 e CLOA 72 após incubação em meio contendo óleo de girassol.....	44
4.8 Efeito de várias fontes de carbono no crescimento e atividade emulsificante de <i>Trichosporon montevideense</i> CLOA 72.....	44
4.8.1 Obtenção do inóculo	45
4.8.2. Ensaios	45
4.9 Caracterização do biossurfactante produzido por <i>T. montevideense</i> CLOA 72	45
4.9.1 Determinação do efeito da concentração do biossurfactante produzido na atividade emulsificante	46
4.9.2 Estudo da atividade emulsificante em diferentes valores de pH.....	46
4.9.3 Estudo de estabilidade do biossurfactante após exposição a 100 °C.....	47
4.9.4 Determinação da atividade emulsificante em diferentes substratos hidrofóbicos	47
4.9.5 Estudo de estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante após exposição a 4 °C e 37 °C.....	47
4.9.6 Estudo de estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante após adição de eletrólitos.....	48
4.9.7 Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Critica (CMC)48	

4.10 Utilização dos biossurfactantes na redução da formação de biofilmes de <i>C. albicans</i> em superfícies de placas de poliestireno.....	49
4.10.1 Preparo das suspensões celulares de <i>Candida albicans</i>	49
4.10.2 Ensaio 49	49
4.11 Determinação da hidrofobicidade celular durante a formação de biofilmes por <i>C. albicans</i> na presença de biossurfactante.....	50
4.12 Determinação do efeito do biossurfactante produzido por <i>Trichosporon montevidense</i> CLO72 na redução do crescimento de <i>C. albicans</i>	51
4.12.1 Preparo das suspensões celulares	51
4.12.2 Ensaio	52
4.13 Calorimetria Isotérmica de Titulação	52
4.14 Efeito do biossurfactante no potencial zeta (ZP) da superfície celular de <i>C. albicans</i>	53
4.15 Avaliação do efeito citotóxico do biossurfactante produzido por <i>T. montevidense</i> CLOA 72 em células embrionárias de rim humano HEK 293A ...	53
4.16 Ensaio de inibição da adesão de <i>C. albicans</i> em células epiteliais bucais pelo biossurfactante produzido por <i>T. montevidense</i> CLOA 72.....	54
4.16.1 Ensaio de adesão.....	55
4.17 Determinação da hidrofobicidade celular de <i>C. albicans</i>	56
4.18 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos biossurfactantes contra células de <i>C. albicans</i>	56
4.19 Análises estatísticas	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Isolamento das leveduras e detecção da atividade emulsificante produzida pelos isolados.....	58
5.2 Identificação das leveduras isoladas	61
5.3 Determinação da tensão superficial do meio após o crescimento de <i>Trichosporon loubieri</i> CLV 20, <i>Geotrichum</i> sp. CLOA 40, <i>T. montevidense</i> CLOA70 e <i>T. montevidense</i> CLOA72.....	64
5.4 Determinação da presença de compostos emulsificantes e surfactantes após extração com acetato de etila e precipitação com etanol	65
5.5 Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelos isolados após crescimento em meio mínimo contendo óleo de girassol.	67

5.5.1. Composição química.....	67
5.6 Purificação e caracterização dos biossurfactantes por cromatografia de gel filtração	68
5.7 Caracterização dos ácidos graxos por cromatografia gasosa	71
5.8 Caracterização dos monossacarídeos por cromatografia gasosa	73
5.9 Cinética de crescimento das leveduras selecionadas e produção dos biossurfactantes.....	75
5.10 Efeito de várias fontes de carbono no crescimento e na atividade emulsificante de <i>Trichosporon montevideense</i> CLOA 72	81
5.11 Determinação do efeito da concentração do biossurfactante na atividade emulsificante.....	85
5.12 Efeito do pH e da temperatura na atividade emulsificante.....	86
5.13 Efeito de diferentes substratos hidrofóbicos na atividade emulsificante	86
5.14 Efeito da adição de eletrólitos na estabilidade da emulsão	88
5.15 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade emulsificante	90
5.16 Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)	90
5.17 Utilização dos biossurfactantes na redução da formação de biofilmes de <i>C. albicans</i> em superfícies de placas de poliestireno.....	92
5.18 Determinação do efeito do biossurfactante produzido por <i>Trichosporon montevideense</i> CLO72 na redução do crescimento de <i>C. albicans</i>	96
5.19 Determinação da hidrofobicidade celular durante a formação de biofilmes por <i>C. albicans</i> na presença de biossurfactante	98
5.20 Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)	100
5.21 Efeito do biossurfactante no potencial zeta (ZP) da superfície celular de <i>C. albicans</i>	104
5.22 Teste de citotoxicidade do biossurfactante em células de mamífero.....	106
5.23 Ensaios de inibição da adesão de <i>C. albicans</i> em células epiteliais bucais pelo biossurfactante produzido por <i>T. montevideense</i> CLOA 72 e alteração da hidrofobicidade celular.....	109
5.24 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do biossurfactante produzido por CLOA72 em células de <i>C. albicans</i>	111
6. CONCLUSÕES	113
5. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	115

ANEXO 1- Testes bioquímicos e fisiológicos dos isolados deste estudo	132
ANEXO 2- Artigo 1	133
ANEXO 3- Artigo 2	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Crescimento, atividade emulsificante e estabilidade da emulsão por culturas livres de células das leveduras isoladas de efluentes de uma indústria de laticínios **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2 - Identificação das leveduras com base na análise de seqüências das regiões D1/D2 do 26 rDNA e regiões ITS1 e ITS2 do rDNA 62

Tabela 3- Atividade emulsificante e surfactante dos compostos recuperados do meio livre de células dos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72..... 66

Tabela 4- Caracterização parcial do biossurfactantes isolados do meio de crescimento das leveduras CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72..... 67

Tabela 5- Composição de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos pelos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72..... 72

Tabela 6. Composição de monossacarídeos dos biossurfactantes das leveduras *Trichosporon. loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp CLOA 40, *T. montevidense* CLOA 70 e *T. montevidense* CLOA72 74

Tabela 7. Efeito da adição de eletrólitos na atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA 72. 89

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 (A, B e C). Perfil de eluição do biossurfactantes dos isolados CLV 20, CLOA40 e CLOA70 em cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200). 69
- Figura 2 (A e B). Perfil de eluição do biossurfactante obtido do isolado CLOA72 em cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200). 70
- Figura 3. Crescimento e produção de biossurfactante por *Trichosporon loubieri* CLV20 em meio mínimo mineral adicionado de óleo de girassol..... 77
- Figura 4. Crescimento e produção de biossurfactante por *Getrichum* sp. 40 em meio mínimo mineral adicionado de óleo de girassol. 78
- Figura 5. Crescimento e produção de biossurfactante por *T. montevideense* CLOA70 em meio mínimo mineral adicionado de óleo de girassol.. 79
- Figura 6. Crescimento e produção de biossurfactante por *Trichosporon montevideense* CLOA 72 em meio mínimo mineral adicionado de óleo de girassol.. 80
- Figura 7- Crescimento (A) e atividade emulsificante (B) de *T. montevideense* CLOA 72 em meio mineral adicionado de diferentes fontes de carbono.. 83
- Figura 8 - Efeito da concentração do biossurfactante extraído do meio de crescimento livre de células de *T. montevideense* CLOA72 na atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E_{24})..... 85
- Figura 9 - Atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *T. montevideense* CLOA72 na fase aquosa, utilizando diferentes substratos hidrofóbicos..... 87

Figura 10. Valores de tensão superficial da água em função de diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *T. montevideense* CLOA72..... 91

Figura 11- Percentual de redução na formação de biofilmes por *Candida albicans* CC na superfície de placas de poliestireno, na presença de diferentes concentrações dos biossurfactantes produzidos pelos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA 72,..... 93

Figura 12- Células de *Candida albicans* aderidas à superfície de placa de poliestireno na ausência do biossurfactante e na presença de biossurfactante... 94

Figura 13- Concentração celular de *Candida albicans* em meio adicionado de diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *T. montevideense* CLOA72 97

Figura 14. Medida de hidrofobicidade celular durante a formação de biofilmes de *Candida albicans* CC na ausência e na presença de de biossurfactante..... 99

Figura 15. Curva de titulação calorimétrica do biossurfactante em células de *C. albicans*..... 101

Figura 16 (A e B). Valor de CMC obtido por tensiômetro e calor de interação do biossurfactante com água, obtido por ITC..... 103

Figura 17 (A e B). Titulações calorimétricas ($\Delta H/Kcal$) e medida de potencial zeta (ζ/mV) após injeções sucessivas do biossurfactante em solução aquosa contendo células de *C. albicans* CC. 105

Figura 18: Viabilidade de células HEK193 na presença de diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *T. montevideense* CLOA72 107

Figura 19: Número de células de *Candida albicans* 18 aderidas a CEB na presença de varias concentrações do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72. Ensaio realizado em 3 repetições. 110

Figura 20 - Efeito dos biossurfactantes produzido por *T. motevideense* CLAO72 no crescimento de *C. albicans* 18 em diferentes concentrações. Ensaio realizado após 24 h de incubação a 35 °C e em três repetições. 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

% - por cento

ΔH - entalpia de reação

μg - microgramas

Kcal- quilocaloria

L- microlitro

mol - micromol

$(NH_4)_2SO_4$ - Sulfato de amônio

ABDAC -alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride

BC- benzethonium chloride

BDA- agar dextrose batata

CEL- celobiose- lipídio

cm - centímetros

CMC- concentração micelar crítica

D1/D2- domínio da região ribossomal 26S do DNA

DNA- ácido desoxirribonucléico

DO - densidade óptica

E₂₄ índice de emulsificação

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

g - grama

h - hora

HCl- ácido hidrocloreto

HTAB- brometo de hexadecyltrimethylammonium

ITS1 e ITS2- seqüências internas transcritas

K₂HPO₄. fosfato de potássio monobásico

kg - quilograma

KH₂PO₄ - fosfato de potássio dibásico

L - litro

Log UFC/mL- logaritmo de unidade formadora de colônia por mililitro

MATH- adesão de micro-organismos a hidrocarbonetos

Mel- mannosil-eritritol-lipídeo

Mg - micrograma

mg - miligrama

MgSO₄ - sulfato de magnésio

min - minuto

M - Molar

mN/m - mili Newtons por metro

MOPS - ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NaCl - cloreto de sódio

NCCLS - National Commitee for Clinical Laboratory Standards

NH₄Cl - cloreto de amônio

NH₄NO₃ - nitrato de amônio

nm - nanômetro

°C - graus Celsius

PBS - salina tamponada em fosfato

pH - potencial hidrogeniônico

PUM -phosphate urea-magnesium

rpm -rotações por minuto

SB - Sabouraud

SDS - dodecil sulfato de sódio

SLAE - sucrose lauric acid ester

TTAB - brometo do amônio do trimethyl de tetradecyl

Tween 20 - Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate

v/v - volume por volume

YNB - Yeast nitrogen base

pmol - picomol

ζ - Potencial zeta (mV)

RESUMO

Novas linhagens de leveduras produtoras de biossurfactantes foram isoladas a partir de uma planta de tratamento de efluentes de uma indústria de laticínios. Estas linhagens foram identificadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon*, *Galactomyces*, *Geotrichum* e *Candida* baseada na sequências da região D1/D2 do rDNA e TS1 e ITS2 do 26S do rDNA. Entre as 32 linhagens de leveduras produtoras de emulsificantes, 13 mostraram atividade emulsificante (E_{24}) após 2 meses de incubação. As emulsões formadas se mantiveram estáveis por até 2 meses de incubação, com valores de atividade emulsificante (E_{24}) variando de 7,32% para 78,52%. As maiores taxas de atividade emulsificante foram observadas em emulsões produzidas a partir das culturas de *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLOA 70 e *T. montevidense* CLOA 72, com valores de E_{24} em torno de 71,29%, 77,45%, 65,80% e 78,52%, respectivamente. Estas linhagens reduziram a tensão superficial do meio de crescimento com valores que variaram de 40,85 mN/m a 52 mN/m. Os surfactantes apresentam diferentes tipos de ácidos graxos, com uma prevalência de ácidos graxos contendo 18 carbonos (39,56% a 85,77% do conteúdo total). As análises dos monossacarídeos presentes nos surfactantes indicaram a prevalência de xilose para os biossurfactantes produzidos por CLV20 e CLOA70, manose para biossurfactante produzido por CLOA72 e galactose para biossurfactante produzido por CLOA40. A atividade emulsificante foi dependente da fonte de carbono no meio de cultura, com maior atividade observada quando óleo de girassol e glicose foram utilizados no meio de crescimento de CLOA72. A atividade emulsificante do biossurfactante apresentou valores acima de 70% nas concentrações de 3 mg/mL a 3,5 mg/mL, e uma atividade superior a 75% em concentrações acima de 4,5 mg/mL. A atividade emulsificante foi estável em uma ampla faixa de pH (2-10), e depois do tratamento térmico a 100 °C. A atividade emulsificante foi igualmente estável após a adição de 30% dos sais NaCl, KCl e NaHCO₃. O biossurfactante foi capaz de emulsificar diferentes substratos hidrofóbicos. A concentração micelar crítica foi estimada em 2,2 mg/mL, indicando uma tensão superficial da água de 48,4 mN/m.

Este estudo também, avaliou o efeito do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 na formação de biofilmes da linhagem de *Candida albicans* CC isolada de canal apical. A maior redução (87,41%) na formação de biofilmes foi observadas na concentração de 16 mg/mL do biossurfactante. A interação de células de *C. albicans* CC com biossurfactante foi caracterizada por titulação calorimétrica isotérmica e potencial zeta. O processo de saturação das células de *C. albicans* pela adição de 1,3 mg/mL/OD₆₀₀. é endotérmico ($\Delta H^\circ = +1284 \pm 5,1$ Cal/mg.DO₆₀₀) ocorrendo com um elevado aumento de entropia ($T\Delta S^\circ = +10635,0$ Cal/mg.DO₆₀₀). A taxa de energia calórica liberada a partir da concentração mínima de saturação sofreu uma brusca diminuição, indicando uma saturação do sistema células-biossurfactante. O potencial zeta da superfície celular foi monitorado como uma função da concentração do biossurfactante adicionado à suspensão celular. Os dados sugerem que cargas líquidas de superfície das células são parcialmente neutras, uma vez que o valor do potencial zeta variou entre -16 mV a - 6 mV durante a titulação. Estas alterações da superfície podem contribuir para a inibição da adesão inicial de células de *C. albicans* CC em superfície hidrofóbicas. O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 não teve qualquer efeito citotóxico em células embrionárias de rim humano HEK 293A nas concentrações de 0,25 a 1 mg/mL. O tratamento com o biossurfactante (CLOA72) reduziu a aderência de *C. albicans* 18 em células bucais em 85,2%. Este estudo sugere uma possível aplicação de biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 na inibição da formação de biofilmes sobre superfícies plásticas e inibição da aderência a superfícies biológicas (células do hospedeiro) por linhagens de *C. albicans*.

ABSTRACT

New strains of biosurfactants producing yeast were isolated from a sewage treatment plant of a dairy product industry. These strains were identified as belonging to the genus *Trichosporon*, *Galactomyces*, *Geotrichum* and *Candida* based on the sequences of the D1/D2 region of 26S rDNA and ITS1-ITS2 from the rDNA gene. Among the 32 yeast isolated, 13 showed emulsifying activity (E_{24}) after 2 months of incubation. The emulsified solution remained stable for up to 2 months of incubation, with values ranging from 7.32% to 78.52%. The highest emulsification rates were observed in emulsions produced by supernatant cultures of *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLOA 70 and *T. montevidense* CLOA 72, with values of E_{24} to 71.29%, 77.45%, 65.80% and 78.52%, respectively. These strains reduced the surface tension of the growth medium to values that ranged from 40.85 mN/m to 52 mN/m. The surfactants contained different types of fatty acids, with a prevalence of molecules containing 18 carbons (39.56% to 85.77% of the total solution content). The analysis of monosaccharides present in the surfactants indicated the prevalence of xylose for biosurfactants produced by CLV20 and CLOA70, manose for biosurfactant produced by CLOA72 and galactose for biosurfactant produced by CLOA40. The emulsifying activity was dependent on the carbon source in the culture medium, with higher activity observed when sunflower oil and glucose were used. The emulsifying activity of the biosurfactant presented values above 70% at concentrations of 3 mg/mL to 3.5 mg/mL, and above 75% at concentrations above 4.5 mg/mL. The emulsifying activity was stable in a wide range of pH (2-10), and after heat treatment at 100 °C. The emulsifying activity was also stable after the addition of 30% of the salts NaCl, KCl and NaHCO₃. The biosurfactant was able to emulsify a wide range of hydrophobic substrates. The critical micellar concentration estimated was in 2.2 mg/mL, giving a surface tension of water of 48.4 mN/m. This study also, evaluated the effect of yeast biosurfactant *T. montevidense* CLOA72 in the formation of biofilms by *Candida albicans* CC isolated from apical tooth canal. The greatest reduction (87.41%) in the formation of biofilms were observed at a concentration of 16 mg/mL. The interaction of cells of *C. albicans* CC with biosurfactant characterized was by isothermal titration calorimetry and zeta potential. The process of saturation

of the cells of *C. albicans* by the addition of 1.3 to 5.1 is endothermic ($(H^{\circ}\Delta = +1284 \pm 5.1 \text{ Cal/mg.OD}_{600})$) occurring with a high increase of entropy ($(\Delta S^{\circ} = +10635,0 \text{ Cal/mg.OD}_{600})$). The rate of caloric energy released from the minimum concentration of saturation has decreased sharply, indicating a saturation of the cell-biosurfactant. The rate of caloric energy released from the minimum inhibitory concentration decreased sharply, indicating cell saturation by the biosurfactant. The zeta potential of the cell surface were monitored as a function of the concentration of the biosurfactant added to cell suspension. The data suggest that the net surface charges of the cells is partially neutral, since the value of zeta potential ranging between -16 mV to - 6 mV during the titration. These changes of the surface can contribute to the inhibition of initial adherence of cells of *C. albicans* in hydrophobic surface. The biosurfactant produced by *T. montevidense* CLOA72 did not have any cytotoxic effect in HEK 293A cell line at the concentrations of 0.25 to 1 mg/mL. The treatment with the biosurfactant CLOA72 reduced the adhesion of *C. albicans* 18 to buccal cells in 85.2%. This study suggests a possible application of biosurfactant produced by *T. montevidense* CLOA72 in inhibiting the formation of biofilms on plastic surfaces and inhibition of adherence to biological surfaces (cells of the host) by strains of *C. albicans*.

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos anfipáticos amplamente utilizados em diversos setores industriais por apresentarem propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases de líquidos imiscíveis.

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. Estima-se que a produção mundial exceda 3 milhões de toneladas por ano, sendo utilizados principalmente como matéria-prima para a fabricação de detergentes de uso doméstico.

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo. Estes compostos são geralmente tóxicos ao ambiente e por não serem biodegradáveis podem persistir e acumular no ambiente, tornando a sua produção e uso um risco. O crescimento da preocupação ambiental dos consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, tem resultado em um interesse crescente nos surfactantes biológicos como uma alternativa para os surfactantes sintéticos existentes.

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes.

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos vêm despertando considerável interesse devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e estabilidade elevada em valores extremos de pH e de temperatura. Além disso, os biossurfactantes podem apresentar grande diversidade de estrutura química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular.

Atualmente, os biossurfactantes não são amplamente utilizados pela indústria, devido ao seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos de alto custo.

Várias medidas podem reduzir o custo de produção dos biossurfactantes, como o uso de fontes alternativas de nutrientes de baixo custo, como subprodutos

agrícolas ou de resíduos industriais, melhoramento ou obtenção de novas linhagens de micro-organismos produtores e a otimização dos processos de produção.

Biossurfactantes têm aplicação potencial na agricultura, na indústria do petróleo, na indústria têxtil, em lavanderias, no processamento de metais, na indústria de papel e celulose, na indústria de pintura, na indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal e na solubilização e emulsificação de produtos químicos tóxicos, acelerando a biodegradação destes compostos em ambientes contaminados. Surfactantes também são importantes para o setor farmacêutico e de alimentos. Em muitos países, as autoridades de saúde têm reforçado as restrições e limitações ao uso de emulsificantes sintéticos em alimentos. Mesmo não havendo muitos biossurfactantes disponíveis no mercado e sendo a aprovação do uso dessas moléculas em alimentos recente e limitada a alguns países, é grande o interesse nestas biomoléculas, que podem fornecer propriedades novas aos alimentos, não presente nos surfactantes sintéticos. Quanto ao setor farmacêutico, pesquisas têm mostrado o potencial terapêutico dos biossurfactantes como agentes antitumorais, antibacterianos, antivirais e inibidores da formação de biofilmes por micro-organismos patogênicos.

A busca por processos inovadores de obtenção de produtos, que considerem não apenas a exploração econômica, mas busquem ganhos de compensação econômica ligada à segurança social do produto, é primordial para a sobrevivência do setor industrial frente à crescente competição e exigências do mercado consumidor. Isto requer a valorização de tecnologias não poluidoras, geradoras de produtos biodegradáveis ou recicláveis e de poucos resíduos. A tecnologia dos biossurfactantes potencialmente preenche estes requisitos. No entanto, para atender a demanda do setor industrial é importante que se tenha linhagens microbianas com grande potencial de produção destes compostos em condições de produção padronizadas e que os surfactantes produzidos estejam bem caracterizados quimicamente.

Considerando todos os aspectos referentes aos biossurfactantes já citados, este trabalho se propõe a isolar micro-organismos produtores de biossurfactantes, caracterizar quimicamente os biossurfactantes produzidos e testar algumas de suas possíveis aplicações como agente emulsificante e inibidor de adesão de micro-organismos em superfícies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas que possuem tanto grupamentos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, sendo, portanto, denominadas de moléculas anfipáticas. São geralmente constituídas por uma cadeia de hidrocarbonetos associada a um grupo iônico (aniônico ou catiônico) ou anfotérico. Os hidrocarbonetos conferem uma característica apolar à molécula do surfactante, enquanto que os agrupamentos iônicos ou anfotéricos constituem a porção polar da molécula (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Em função da presença dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes possuem características tenso-ativas, ou seja, são capazes de associarem-se espontaneamente entre interfaces líquidas (óleo/água e água/óleo) com diferentes graus de polaridade (DESAI e BANAT, 1997). Com isso, os surfactantes reduzem a tensão superficial e interfacial, levando a formação de grandes agregados moleculares, denominados de micelas. Devido a essas propriedades, os surfactantes possuem características de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases líquidas imiscíveis (DESAI e BANAT, 1997).

A formação de micelas está associada à concentração micelar crítica (CMC) do surfactante. Abaixo de sua CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros. À medida que se aproxima da CMC, ocorre um equilíbrio dinâmico, e micelas são formadas envolvendo a associação de 30 a 200 monômeros (MANIASSO, 2001). A CMC depende da estrutura do surfactante e é comumente determinada para avaliar a eficiência de um tenso-ativo na solubilização entre duas fases líquidas (DESAI e BANAT, 1997).

Compostos com propriedades tenso-ativas sintetizados por micro-organismos são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Os biossurfactantes possuem algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, tolerância a altas temperaturas, variações de pH e altas concentrações de sal, possuem alta atividade espumante, excelente atividade superficial e interfacial (diminuem a tensão

superficial em menores concentrações). Os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos renováveis (óleos vegetais e resíduos industriais), e suas estruturas físicas e químicas podem ser modificadas por de engenharia genética ou por técnicas bioquímicas, permitindo o desenvolvimento de novos produtos para necessidades específicas.

Devido a inúmeras vantagens, os biossurfactantes são utilizados na indústria petroquímica e alimentícia, como aditivos de cosméticos, na biorremediação e em diversas aplicações biotecnológicas (BANAT *et al.*, 2002; DESAI e BANAT, 1997; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos são classificados de acordo com a sua massa molecular e composição química. Os biossurfactantes de baixa massa molecular mais comumente encontrados em micro-organismos incluem glicolípídeos, lipopeptídeos, fosfolípídeos e sais de ácidos graxos e os de alta massa molecular são denominados de poliméricos e incluem as lipoproteínas, os lipopolissacarídeos, os polissacarídeos e os surfactantes particulados (DESAI e BANAT, 1997, ROSENBERG e RON, 1999). Quanto à composição química, as moléculas de biossurfactantes caracterizadas, até o presente momento, apresentam a porção hidrofóbica composta principalmente de resíduos de cadeias de ácidos graxos e a porção hidrofílica constituída principalmente de resíduos de carboidratos, ácidos carboxílicos, fosfato, aminoácidos, peptídeos cíclicos ou álcool (DESAI e BANAT, 1997).

2.2 Avaliação da atividade biossurfactante

A atividade biossurfactante pode ser determinada pelas mudanças na tensão superficial e interfacial e pela estabilização de emulsões.

A tensão superficial da água é de 72 mN/m e pode atingir valores de até 30 mN/m após a adição de surfactantes, assim meios de cultura de micro-organismos podem ser submetidos à determinação da tensão superficial a fim de se avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes durante o crescimento microbiano (DESAI e BANAT, 1997).

A medida da atividade surfactante pode ser ainda detectada pelo método do diâmetro da gota dispersa sobre uma superfície hidrofóbica. Esta metodologia é

rápida e simples e adequada para avaliar a capacidade produtora de biossurfactantes por diferentes micro-organismos como leveduras e bactérias (HILDEBRAND, 1989).

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, caracterizados por uma fase líquida dispersa em gotas microscópicas numa fase contínua, podendo ser denominada água/óleo ou óleo/água se a fase contínua for o óleo ou água, respectivamente. Dependendo da natureza e concentração de um surfactante, a sua adição no sistema pode levar a estabilização de emulsões.

A estabilização de emulsões pelos surfactantes é resultado de três mecanismos: redução da tensão interfacial (estabilização termodinâmica), formação de um filme rígido interfacial que serve como barreira para coalescência (estabilização estérica) e a formação de uma dupla camada elétrica que serve como barreira contra a aproximação dos glóbulos (estabilização eletrostática) (LEUNISSEN *et al.*, 2007).

Na presença de água e óleo, a porção hidrofílica do surfactante é atraída pela água e a porção lipofílica é atraída pelo óleo. Nesse sistema água/óleo (A/O), o agente emulsionante estará na interface com seus grupos orientados para as respectivas fases nas quais é mais solúvel (SOUZA, 2003). Essa interação resulta na diminuição da tensão superficial e aumento da superfície de contato entre as fases, permitindo a homogeneização do sistema.

Além da diminuição da tensão interfacial, a adição de surfactantes poliméricos e não iônicos ao sistema A/O leva a formação de um filme contínuo na interface. Esse filme gera uma repulsão das gotas presentes no sistema que vencendo as forças atrativas de Van der Waals (repulsão estérica), resulta em uma barreira física impedindo a coalescência da emulsão (PALLA e SHAN, 2002). Se a camada não for contínua, as gotículas individuais da emulsão podem coalescer, fundindo-se ao entrar em contato com os pontos sem emulsificante. Isso pode diminuir o grau de dispersão, podendo levar a ruptura ou a quebra da emulsão.

A formação de uma dupla camada elétrica é outro mecanismo de estabilização das emulsões por surfactantes aniônicos. Os surfactantes formam um filme em torno das gotas da emulsão, podendo apresentar cargas de natureza aniônica ou catiônica. Assim, os íons formam ao redor das gotas uma dupla camada eletrostática que consiste em uma camada estacionária aderida à superfície da gota

e outra móvel e de espessura maior denominada camada difusa. Na primeira camada, na ausência de agitação térmica, as cargas das gotas são neutralizadas por íons de carga oposta, denominados de contra-íons. Entretanto, as cargas de superfície não completamente equilibradas por esta camada necessitarão de complementação de íons predominantemente na região da camada difusa. Ao redor de cada gota existe, portanto, uma atmosfera de íons de carga oposta que formam uma camada de espessura definida (PINHO e STORPIRTIS, 1998).

Se as gotas dispersas na fase contínua não possuísem a dupla camada elétrica, elas poderiam se aproximar o suficiente para que a força atrativa de van der Waals possibilitasse a sua junção. Entretanto, a existência desta dupla camada elétrica promove a repulsão entre as partículas, estabilizando a emulsão (CASTELLAN, 1986).

A atividade emulsificante é outro parâmetro a ser considerado na seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes. Os ensaios consistem na avaliação da emulsificação de compostos imiscíveis na fase aquosa, como hidrocarbonetos ou óleos vegetais, após a adição de sobrenadantes de culturas microbianas (DESAI e BANAT, 1997). Essa atividade é expressa pelo índice de emulsificação (E_{24}). O método envolve a agitação contínua de duas fases imiscíveis, como por exemplo, meio de cultura e querosene ou um hidrocarboneto (alifático ou aromático). Após 24 h, determina-se o percentual de emulsificação dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa (COOPER e GOLDENBERG, 1987). A determinação da atividade emulsificante permite avaliar a estabilidade da emulsão formada em diferentes condições físicas e químicas, como pH, temperatura, concentração do composto surfactante produzido e presença de íons.

2.3 Produção de biossurfactantes por leveduras e fungos filamentosos

Embora inúmeros trabalhos tenham demonstrado a produção de biossurfactantes por bactérias, poucas linhagens de leveduras e fungos filamentosos com capacidade de produzir moléculas com características surfactantes têm sido descritas. Dentre as espécies de leveduras descritas, merecem citação *Torulopsis bombicola*, *C. antarctica*, *Pseudozyma aphidis*, e *Kurtzmanomyces* sp. (COOPER e PADDOCK, 1984; KITAMOTO *et al.*, 1993; RAU

et al., 2005; KAKUGAWA *et al.*, 2002) e dentre as espécies de fungos filamentosos *Ustilago maydis*, *Curvularia lunata* e *Penicillium citrinum* (SPOECKNER *et al.*, 1999; PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002; CAMARGO-DE-MORAIS *et al.*, 2003).

A maioria dos fungos descritos na literatura produz dois tipos de biossurfactantes, os glicolípídeos de baixa massa molecular, e os poliméricos de alta massa molecular. Os glicolípídeos mais comuns são os soforolípídeos e os manosileritritol-lípídeos, que apresentam monossacarídeos ligados a resíduos de ácidos graxos (KITAMOTO *et al.*, 2001), enquanto os poliméricos são constituídos de carboidratos, proteínas e resíduos de ácidos graxos (DESAI e BANAT, 1997).

Os soforolípídeos são compostos pelo açúcar soforose (2-O-glucopiranosil—D-glucopiranosose) ligado a uma cadeia de ácidos graxos. A esta estrutura básica podem ser encontradas variações específicas como a mono ou diacetilação nas posições 6' e 6'' (ASMER *et al.*, 1988) ou a inclusão de um grupamento carboxílico livre (forma ácida) ou um anel lactona macrocíclico (forma lactônica) (ASMER *et al.*, 1988).

Os soforolípídeos são produzidos e excretados pelas linhagens de leveduras *C.bombicola* ATCC 22214 (DANIEL *et al.* 2004). ASMER *et al.* (1988) observaram que *C.bombicola* (ATCC 22214) possui a capacidade de secretar até 12 diferentes formas ou estruturas de soforolípídeos pela utilização de variadas fontes de carbono.

Os manosileritritol-lípídeos (6-O-acetil-2,3-di-O-alcanol- β -D-mannopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-meso-eritritol) (MEL) são glicolípídeos que apresentam manose e eritritol como a porção hidrofílica e grupamentos acetil bem como ácidos graxos como a porção hidrofóbica (RAU *et al.*, 2005). Esses glicolípídeos são produzidos e excretados pelas leveduras *Candida antarctica* (KITAMOTO *et al.*, 1992), *Kurtzmanomyces* sp. I-11(KAKUGAWA *et al.*, 2002) e pelo fungo *Ustilago maydis* DSM 4500 (SPOECKNER *et al.*, 1999).

Os biossurfactantes poliméricos possuem massa molecular acima de 20,000 Da e apresentam excelente atividade emulsificante para diferentes compostos hidrofóbicos. Os biossurfactantes poliméricos são produzidos principalmente por leveduras dos gêneros *Candida* e *Yarrowia* (SARUBBO *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2006).

2.4 Condições para a produção de biossurfactantes

Diversos estudos têm indicado que o tipo de meio utilizado e as condições de crescimento de linhagens de leveduras podem influenciar o rendimento da produção e o tipo de biossurfactante produzido.

A síntese de biossurfactantes por leveduras e fungos filamentosos pode ser influenciada pelo tipo de fonte de carbono presente no meio de cultura que pode reprimir ou induzir sua produção. Em alguns casos, a adição de substratos imiscíveis em água resulta na indução da produção do biossurfactante (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Tulloch *et al.* (1962) observaram que a síntese de soforolipídeos por *Torulopsis magnoliae* somente ocorreu após a adição de ácidos graxos de cadeias longas, hidrocarbonetos ou glicerídeos no meio de crescimento. Cooper e Paddock (1984) também obtiveram um alto rendimento na produção de soforolipídeos a partir de óleo soja e glicose (0,35 g/g de substrato ou 67 g/L) por *C. bombicola*.

Kim *et al.* (1997) estudaram o efeito do óleo de soja e glicose no crescimento e na produção de soforolipídeos por *T. bombicola*. Os autores verificaram que a adição de 100 g/L de óleo de soja ou de 100 g/L de glicose provoca uma diminuição da produção do biossurfactante. Neste estudo, o melhor rendimento na produção ocorreu nas concentrações de 60 a 80 g/L de óleo de soja.

Kim *et al.* (1999) observaram que a produção efetiva do glicolipídeo manosileritritol-lipídeo (MEL) por *Candida* sp. SY16 (*C. antarctica* KTCT 7804) requer a adição de óleo de soja como fonte de carbono e que a adição de glicose e n-hexadecano leva a uma produção insignificante do biossurfactante. Em outro estudo de bioconversão de hidrocarbonetos (*n*-alcanos - C₁₂ a C₁₈) utilizando a levedura *Pseudozyma antarctica* (*C. antarctica* T-34), foi observado uma produção elevada (0,87 g/g de substrato) de manosileritritol-lipídeo (KITAMOTO *et al.*, 2001)

Rau *et al.* (2005) observaram um efeito positivo do pré-crescimento em glicose na produção de MEL pela levedura *P. aphidis* DSM 70725 a partir de óleo de soja. Os maiores rendimentos de MELs (30-35 g/L) foram obtidos utilizando células pré-cultivadas em glicose nas concentrações de 20 e 30 g/L e óleo de soja na concentração de 80 mg/L. Nos ensaios utilizando óleo de soja em concentrações inferiores a 20 g/L e superiores a 30 g/L, a produção foi reduzida. Rau *et al.* (2005)

estudaram também o efeito de compostos nitrogenados na produção de MEL. Os autores observaram uma maior produção de MEL pela levedura *P. aphidis* DSM 70725 nos meios de crescimento contendo NaNO_3 do que em meios adicionados de NH_4NO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração inicial de 25 mol/L.

Spoeckner *et al.* (1999) relataram a produção de uma mistura de glicolipídeos MEL e de celobiose- lipídeo (CEL) pelo fungo *U. maydis* DSM 4500 a partir dos derivados do óleo de soja (ácidos oléicos). Neste estudo, a adição de ácido oléico na fase estacionária provocou uma variação de 2 g/L a 30 g/L de glicolipídeos, sendo 90% de MEL e 10% de CEL (9/1). Entretanto, com a adição de glicose como fonte de carbono durante a fase estacionária, a mistura de glicolipídeos produzida foi alterada, sendo observada uma produção de 10% de MEL e 90% de CEL (1/9).

Estudos têm relatado a produção de biossurfactantes poliméricos por fungos. Recentemente, Camargo-de-Morais *et al.* (2003) descreveram um biossurfactante composto de lipídios, carboidratos e proteínas pelo fungo filamentosso *Penicillium citrinum*. A atividade emulsificante máxima foi obtida pelo crescimento do fungo em meio mineral acrescido de óleo de oliva a 1% (v/v) como fonte de carbono, após 60 h de cultivo do fungo.

Cameron *et al.* (1988) descreveram a produção de grandes quantidades de uma manoproteína, componente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, extraível pela ação de zimolase e Beta-1,3 glucanase. O polímero, composto de 44% de manose e 17% de proteína mostrou ser um excelente agente emulsificante sobre óleos e *n*-alcanos.

2.5 Funções fisiológicas dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos. Estas moléculas possuem grande diversidade de estruturas químicas e propriedades superficiais. Portanto, é esperado que os biossurfactantes de micro-organismos diferentes apresentem funções fisiológicas diferentes que possibilitem ao organismo uma maior competitividade na busca pela colonização de um determinado nicho ecológico. Devido a essas diferenças algumas espécies de micro-organismos podem possuir maior vantagem na colonização de ambientes

específicos do que outras (RON e ROSEMBERG, 2001). Diversos biossurfactantes apresentam também atividade antibacteriana e antifúngica. Outros aumentam o crescimento de micro-organismos na presença de substratos insolúveis em água, seja por aumento da biodisponibilidade de nutrientes, aumento da área superficial disponível ou pela dessorção, aumentando sua solubilidade aparente. Biossurfactantes podem exercer funções importantes na regulação de ligação e liberação das células microbianas a partir de superfícies. Ademais, biossurfactantes podem estar envolvidos na patogênese microbiana, sistemas de “*quorum sensing*”, formação de biofilmes e ainda reduzir a toxicidade causada por metais pesados (RON e ROSEMBERG, 2001). O conhecimento das funções fisiológicas de biossurfactantes auxilia no estudo da aplicabilidade industrial destas moléculas.

Alguns trabalhos enfatizam a degradação de substratos hidrofóbicos e a utilização destes como fonte de carbono por diversas linhagens microbianas, sendo que a maioria das linhagens possui a capacidade de produzir substâncias surfactantes que reduzem a tensão superficial das moléculas possibilitando o acesso do microrganismo ao composto. Inúmeras espécies de bactérias são citadas pela sua capacidade de utilizar compostos imiscíveis em água como hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos (*n*-alcanos) e óleos vegetais. Barathi *et al.* (2001) observaram que uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* isolada de solo contaminado com petróleo possui a capacidade de utilizar *n*-hexadecano, *n*-decano, querosene e óleo cru adicionados em meio mínimo mineral, sendo que a degradação de *n*-hexadecano é acompanhada pela produção de biossurfactante. Santa-ana *et al.* (2002) também observaram que a linhagem *P. aeruginosa* PA1 isolada de ambiente contaminado por óleo produz biossurfactante do tipo ramnolípideo a partir de diferentes fontes de carbono como *n*-hexadecano, óleo de parafina, glicerol e óleo de babaçu.

Assim como as bactérias, algumas linhagens de fungos são capazes de degradar compostos hidrofóbicos e utilizá-los como fonte de carbono. Entretanto, poucos trabalhos citam a produção de biossurfactantes por fungos degradadores de hidrocarbonetos e a participação destes compostos na solubilização de compostos hidrofóbicos.

Biossurfactantes do tipo lipopeptídeos podem desempenhar o papel de agente dispersante para os micro-organismos, bem como agente molhante para a

superfície de células hospedeiras (KITAMOTO *et al.* 2002). Hildebrand *et al.* (1998) relataram a produção de um depsipeptídeo cíclico, viscosina, por *P. fluorescens*, o qual reduz a tensão superficial na epiderme da planta hospedeira, acelerando o molhamento da superfície e dispersão da bactéria. *Serratia marcescens* também produz um depsipeptídeo cíclico não iônico denominado serrawetina, que facilita o molhamento da superfície celular do hospedeiro e a dispersão do patógeno (MATSUYAMA *et al.*, 1989).

Alguns autores têm sugerido uma função importante de soforolipídeos em leveduras osmofílicas. Tem sido sugerido que o soforolipídio produzido por *Candida apicola* a partir de glicose ou frutose atua como material de estoque de carbono extracelular e pode constituir numa estratégia de adaptação à alta força osmótica do meio de crescimento (HOMMEL *et al.*, 1994).

2.6 Aplicações dos biossurfactantes na inibição de adesão e crescimento de micro-organismos

Biossurfactantes são polímeros microbianos anfifílicos e polifílicos que tendem a interagir com as interfaces criadas entre as duas fases de sistemas heterogêneos. Para todos os sistemas interfaciais é conhecido que moléculas orgânicas provenientes da fase aquosa tendem a se imobilizar na interface sólida, formando um filme conhecido como filme condicionado, o qual irá mudar as propriedades da superfície original, tais como molhabilidade e energia superficial. Em analogia ao filme condicionado orgânico, biossurfactantes podem se ligar à superfície por interações hidrofóbicas ou hidrofílicas formando um filme na interface entre a superfície sólida e o meio externo. Esta interação pode afetar a adesão e desorção de micro-organismos (NEU, 1996).

As propriedades da superfície do substrato irão determinar a composição e orientação das moléculas ligadas à superfície. Considerando este mecanismo, a inibição da adesão de micro-organismos a superfícies pode estar associada a modificações nas características iniciais hidrofílicas ou hidrofóbicas da superfície. Em uma interface hidrofílica, o filme condicionado irá mudar a interface de hidrofílica para hidrofóbica. Conseqüentemente, somente células hidrofóbicas serão agora

capazes de interagir com este filme condicionado hidrofóbico. Por outro lado, em uma interface hidrofóbica, os biossurfactantes excretados podem mudar as propriedades da interface de hidrofóbica para hidrofílica, favorecendo a ligação de células hidrofílicas (NEU, 1996).

A capacidade dos micro-organismos aderirem a superfícies não biológicas como cateteres intravenosos, mangueiras, próteses cardíacas, próteses cirúrgicas é um pré-requisito para a colonização de tecidos orgânicos e subsequente infecção. A adesão tem um papel inicial e fundamental no processo de infecção. Por exemplo, a adesão de leveduras do gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans*, a superfícies dentárias constitui um passo essencial no desenvolvimento de estomatites dentárias. A candidíase oral desencadeada por *C. albicans* é normalmente associada à utilização de dispositivos médicos, que acabam por servir de suporte para o crescimento dos micro-organismos.

Tem sido sugerido que a aderência de *C. albicans* a materiais plásticos e tecidos do hospedeiro é mediada principalmente pela hidrofobicidade superficial da célula (CHS), sendo que proteínas e manoproteínas hidrofóbicas da superfície celular têm sido implicadas intimamente neste processo. Tronchin *et al.* (1988) mostraram que durante a formação de tubos germinativos por *C. albicans*, ocorre e expressão de uma camada superficial de proteínas hidrofóbicas fibrilares de massas moleculares de 200, 200, 68 e 60 kDa que são responsáveis pelo aumento da aderência do microrganismo a microesferas de poliestireno. Os autores também mostraram que uma inibição da germinação tem como consequência um decréscimo da adesão de *C. albicans* ao plástico.

Manoproteínas específicas hidrofóbicas também têm sido descritas como mediadoras da adesão de *C. albicans* a superfícies plásticas. Lopez-Ribot *et al.* (1991) identificaram uma manoproteína de massa molecular de 67 kDa na superfície celular de *C. albicans* ATCC 26555, responsável pelo estabelecimento da adesão a microesferas de poliestireno. Neste estudo os autores também observaram que o tratamento das células de *C. albicans* com as enzimas beta-glucanase ou proteases reduz drasticamente a sua capacidade de adesão, bem como a hidrofobicidade celular.

Klotz *et al.* (1985) mostraram que a capacidade de linhagens de *C. albicans* aderirem a superfícies de diferentes plásticos, tais como: politetrafluoretileno,

polietilenotereftalato, polimetilmetacrilato e poliestireno, está relacionada com a hidrofobicidade da superfície celular destes micro-organismos.

A resistência de biofilmes de *C. albicans* a agentes antifúngicos tem sido demonstrada por alguns autores. Chandra *et al.* (2001), estudando a resistência de biofilmes de *C. albicans* formados na superfície de polimetilmetacrilato a antifúngicos, observaram uma alta resistência a fluconazol, nistatina, anfotericina B e clorhexidina. A resistência de biofilmes de *C. albicans* em cateteres a fluconazol e anfotericina B também tem sido descrita (HAWSER e DOUGLAS, 1995). A associação da resistência a antifúngicos e a capacidade invasiva de *C. albicans* presentes em biofilmes associados a cateteres parece contribuir de maneira significativa com as altas taxas de mortalidade relacionadas a episódios de candidemia (NGUYEN *et al.*, 1995).

Considerando que a hidrofobicidade da superfície celular seja um mecanismo importante para a adesão e estabelecimento de biofilmes por *C. albicans*, e que a inibição da interação hidrofóbica do micro-organismo com superfícies de dispositivos médicos possa reduzir drasticamente a formação de biofilmes, a utilização de biossurfactantes para a inibição e destruição de biofilmes é uma nova estratégia de controle microbiano, seja em superfícies não biológicas ou em células animais. Alguns trabalhos têm demonstrado a utilização efetiva de biossurfactantes na redução da formação de biofilmes microbianos e na inibição da adesão de bactérias e fungos em diversos tipos de materiais, como: cateteres de silicone, placas de material inoxidável e placas de vidro (RODRIGUES *et al.* 2006). Entretanto, são escassos os trabalhos referentes à utilização de biossurfactantes produzidos por leveduras para a inibição de adesão de micro-organismos em substratos e formação de biofilmes, principalmente por micro-organismos patogênicos oportunistas.

Busscher *et al.* (1997) observaram que biossurfactantes do tipo glicolípido obtidos a partir de culturas de *Streptococcus thermophilus* B se mostraram efetivos na inibição de adesão das leveduras *C. albicans* e *Candida tropicalis* em borracha de silicone quando utilizado na concentração de 30 mg/mL. Rodrigues *et al.* (2006), estudando o efeito de um biossurfactante do tipo glicolípido extraído de *Streptococcus thermophilus* A em células de *C. albicans* GBJ 13/4A e *C. tropicalis*

GB9/9 ambas isoladas de próteses dentárias, verificaram uma redução de 15 a 23% de adesão em placas de 96 poços na presença de 40 mg/mL do biossurfactante.

O mecanismo do filme condicionado pode ser sugerido para a inibição da adesão de células de *C. albicans* a superfícies plásticas com características hidrofóbicas, uma vez que a hidrofobicidade da superfície celular é um fator determinante da adesão e formação de biofilmes por este microrganismo (NEU, 1996). A inibição da adesão e formação de biofilmes em materiais plásticos por *C. albicans* durante exposição à biossurfactantes produzidos por bactérias lácticas tem sido constatada em poucos estudos (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Biossurfactantes do tipo glicolípídeos obtidos de fungos podem apresentar também várias atividades biológicas, tais como: inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e inibição do crescimento de fungos e algas protistas (KITAMOTO *et al.*, 1993; SUN *et al.*, 2004). Segundo Kitamoto *et al.* (1993), a atividade antimicrobiana dos surfactantes é devida principalmente à sua alta atividade solubilizante e que, em geral, o efeito dos biossurfactantes em bactérias é mais acentuado em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas, decorrente principalmente de diferenças na parede celular destes microorganismos. Os glicolípídeos MEL-A e MEL-B obtidos de *C. antarctica* T-34 e soforolípídeos provenientes de *C. apicola* IMET 43747 apresentaram alta atividade contra bactérias Gram-positivas. Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) (mg/L) de MEL foram menores que os valores observados para os surfactantes sintéticos, sacarose monodecanoato e Span 20 (sorbitan monodecanoato) (KITAMOTO *et al.*, 1993).

2.7 Efeitos na biodegradação e remoção de compostos hidrofóbicos

O crescimento e a degradação microbiana de compostos hidrofóbicos de baixa solubilidade presentes no ambiente, incluindo óleos, hidrocarbonetos do petróleo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas, em concentrações acima de sua solubilidade em água, são dificultados pela falta de disponibilidade destes compostos à ação microbiana (BARATHI e VASUDEVA, 2001). Os biossurfactantes apresentam potencial de utilização na remediação de ambientes

contaminados por esses compostos hidrofóbicos, devido a sua característica de aumentar a solubilidade e disponibilidade à degradação microbiana, principalmente em solos (MULLIGAN, 2005).

De acordo com Mulligan (2005), novos tipos de biossurfactantes podem ser obtidos a partir de micro-organismos isolados de solos contaminados com moléculas hidrofóbicas, como por exemplo, hidrocarbonetos. No entanto, pouco é conhecido sobre o potencial de produção de surfactantes por micro-organismos em solos contaminados.

Alguns estudos têm relatado o efeito positivo de biossurfactantes produzidos por fungos na degradação de moléculas de baixa solubilidade em água. Hua *et al.* (2003) relataram que a levedura *Candida antarctica* T-34 produz o biossurfactante denominado de BS-UC a partir de *n*-undecano ($C_{11}H_{24}$), o qual influencia positivamente a emulsificação e biodegradação de uma variedade de *n*-alcanos e querosene. Neste estudo, na presença de 2% de BS-UC, a percentagem de degradação de querosene aumentou de 65 para 80,4% após 4 dias de fermentação.

Schippers *et al.* (2000) estudaram o efeito de soforolipídeos obtidos de *C. bombicola* (ATCC 22114) na biodegradação de fenantreno (concentração inicial de 80 mg/L) presente numa suspensão de solo (10%) pela bactéria *Sphingomonas yanoikuyae*. Após 36 h de incubação, a concentração residual de fenantreno foi de 0,5 mg/L na presença de 500 mg/L de soforolipídeos e de 2,3 mg/L na sua ausência. Foi observado, também, que a CMC dos soforolipídeos em água era de 4 mg/L, aumentando para 10 mg/L em presença de 10% de solo, indicando que as partículas de solo adsorvem o biossurfactante. Oberbremer *et al.* (1999), adicionando soforolipídeos obtidos de *C. bombicola* (ATCC 22114) a uma suspensão com 10% de solo e 1,35% de uma mistura de hidrocarbonetos, observaram que 90% da concentração inicial de hidrocarbonetos foram degradados em 79 h, enquanto 81% eram degradados em 114 h na ausência de soforolipídeos.

Estes estudos enfatizam o potencial de utilização de biossurfactantes em aplicações ambientais, como a biorremediação de ambientes contaminados. Nesses ambientes, os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente podem ser usados microorganismos produtores ou a adição de

fatores de crescimento de micro-organismos indígenas capazes de produzir estes compostos.

2.8 Utilização de biossurfactantes na indústria

O potencial para estabilização de emulsões, assim como o de redução da tensão interfacial com CMC bem abaixo a de surfactantes comerciais tem levado ao interesse crescente pela utilização de biossurfactantes na recuperação de óleo bruto em sistemas de poços de petróleo e tubulações (DESAI e BANAT, 1997).

A recuperação de petróleo contido em poços requer a utilização de compostos surfactantes que diminuam a tensão interfacial e as altas forças de capilaridade encontradas nos poros das rochas. Os biossurfactantes são compostos com características adequadas para recuperação de petróleo, pois além de diminuir a tensão interfacial para os valores desejados, são estáveis em condições de alta pressão e altas concentrações de sais encontrados em poços de extração (DESAI e BANAT, 1997). Hayes *et al.* (1986) mostraram que a utilização de Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 reduz a viscosidade do óleo bruto pesado venezuelano de 200.000 a 100 cP, facilitando seu bombeamento. Banat *et al.* (1991) têm demonstrado a utilização de biossurfactantes para remoção de óleo cru de tanque de estocagem da Co. Óleo Kuwait. Neste estudo, foi observado um aumento de 90% na recuperação de óleo.

Devido as suas propriedades emulsificantes e umectantes, os biossurfactantes também são atrativos para o setor de alimentos e setor de cosméticos (DESAI e BANAT, 1997). O biossurfactante produzido pela levedura *Candida utilis* NCYC 769 se mostrou eficaz para estabilizar emulsões de óleo de milho e emulsões de óleo de girassol utilizadas na elaboração de creme de salada (SHEPHERD *et al.*, 1995). O biossurfactante soforolípido produzido por *C. bombicola* ATCC 22214 tem sido adicionado à formulação de creme de pele contendo propilenoglicol, sendo que a formulação obtida se mostrou um excelente composto umectante e incapaz de causar irritações na pele (YAMANE, 1987).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e selecionar leveduras a partir de amostras de efluentes de uma indústria de laticínios com potencial de produção de moléculas biossurfactantes e obter compostos biossurfactantes tecnologicamente aplicáveis, considerando suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar, selecionar e identificar leveduras com potencial para a produção de biossurfactantes a partir de amostras de efluentes de uma indústria de laticínios;
- Caracterizar os biossurfactantes produzidos pelos isolados selecionados quanto à atividade emulsificante e surfactante;
- Caracterizar quimicamente os biossurfactantes isolados;
- Determinar o efeito dos biossurfactantes na inibição de adesão de *Candida albicans* em superfícies de poliestireno;
- Determinar o efeito dos biossurfactantes na inibição da formação de biofilmes de *Candida albicans* em superfícies de poliestireno;
- Determinar o efeito fungistático dos biossurfactantes contra linhagens de *Candida albicans*
- Determinar o efeito dos biossurfactantes na inibição de adesão de *Candida albicans* em células epiteliais bucais humanas;
- Determinar o efeito dos biossurfactantes na viabilidade de células de mamífero da linhagem HEK 293.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento das leveduras

As leveduras foram isoladas pela técnica de enriquecimento a partir de amostras de 250 mL de diferentes unidades de uma estação de tratamento biológico de efluentes de uma indústria de laticínios, situada na região metropolitana de Belo Horizonte. Para o estudo foram coletadas 3 amostras da lagoa de aeração, 3 amostras do tanque de aeração do sistema de lodo ativado e 3 amostras da lagoa de vazão. As amostras foram transportadas em uma caixa de isopor contendo gelo para o Laboratório de Mecanismos de Infecções Fúngicas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e processadas.

Para o isolamento, amostras de 20 mL foram diluídas de 1:10 em meio mínimo mineral líquido (MM) contendo por litro: 3,4 g de K_2HPO_4 , 4,3 g de KH_2PO_4 , 0,3 g de $MgCl_2 \cdot 2H_2O$, 1,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g de extrato de levedura, acrescidos de 20 g/L de óleo de girassol e cloranfenicol na concentração de 0,2 g/L. Os frascos Erlenmeyer contendo um volume final de 200 mL foram incubados a temperatura de 25 °C sob agitação constante de 200 rpm. Após 96 h de incubação, as amostras removidas da cultura foram diluídas serialmente em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e plaqueadas em meio Ágar batata dextrose (BDA) contendo por litro: 200 g de infusão à base de batatas, 20 g de D-glucose e 18 g de Agar, acrescido de cloranfenicol (0,2 g/L). As placas foram incubadas por até 120 h a uma temperatura de 25 °C. Após o crescimento, colônias isoladas de diferentes morfotipos foram transferidas com auxílio de uma alça metálica para placas contendo meio BDA e incubadas a temperatura de 25 °C por 72 h.

Para a manutenção das culturas estoques, as leveduras foram cultivadas em tubos contendo meio BDA sólido inclinado. Os tubos foram incubados a 25 °C por 48 h e, após o crescimento, os cultivos foram submersos em óleo mineral estéril e conservados sobre refrigeração a uma temperatura de 4 °C.

As leveduras também foram preservadas em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1,0%, fosfato de sódio monobásico 0,2%) acrescido de 20 % de glicerol e preservados em freezer a -70 °C.

4.2 Detecção da atividade emulsificante produzida pelos isolados

4.2.1 Crescimento dos isolados

As leveduras obtidas pelo método de enriquecimento foram inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mínimo mineral, acrescido de 20 g/L de óleo de girassol. Os frascos foram incubados sob agitação constante de 200 rpm a 25 °C por até 144 h. O crescimento foi monitorado pela medida da densidade ótica a 600 nm utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV120. Após a incubação, as células das leveduras foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 5000 rpm por 20 min, e o meio livre de células foi preservado sob refrigeração a 4 °C até o momento de detecção da atividade emulsificante.

4.2.2 Método da atividade emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada pelo método do índice de emulsificação descrito por CAMERON *et al.* (1988). Nestes ensaios, amostras de 4 mL da cultura livre de células filtradas em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de diâmetro de poro foram adicionadas a tubos com tampa rosqueável contendo 6 mL de tolueno. Cada tubo foi submetido à homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h a temperatura ambiente. O índice de emulsificação foi determinado dividindo-se a altura da camada emulsionada (cm) pela altura da camada total do líquido. O valor obtido foi multiplicado por 100 (Equação 1). Os ensaios foram realizados em três repetições.

$$E_{24} = \frac{\text{Altura da camada emulsionada}}{\text{Altura total do líquido}} \times 100 \%$$

Equação 1: Equação de determinação do Índice de emulsificação (E_{24}) expresso em porcentagem.

Os índices de emulsificação também foram avaliados após 2 meses do preparo das emulsões como descrito acima, visando à determinação da estabilidade da atividade emulsificante. As emulsões preparadas foram mantidas à temperatura de 30 °C.

4.3 Identificação das leveduras

A identificação das leveduras isoladas foi realizada com base em critérios morfológicos e bioquímicos definidos como metodologia padrão (YARROW, 1998) e com auxílio das chaves presentes em Kurtzman e Fell (1998). Os isolados também foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA, utilizando-se os iniciadores NL1 e NL4, segundo Kurtzman e Robnett (1998), e sequenciamento da região ITS1 e ITS2 do rDNA, utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4, segundo White (1990).

4.3.1 Extração do DNA das leveduras

A extração de DNA dos isolados foi realizada segundo o protocolo descrito por Lãs Heras-Vazquez (2003), com modificações. Culturas puras das leveduras foram cultivadas em Agar Sabouraud (2% de ágar, 2% de desxtrose, 1% de extrato de levedura, 1% de peptona de carne) por 48 h a 28 °C. Após este período, colônias isoladas foram transferidas para tubos cônicos de 2,0 mL, lavadas em 1,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e centrifugadas por 5 min a 10000 rpm (Eppendorf 5417R). o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de Tampão SDS/Triton X-100 (1,5% de Dodecil Sulfato de Sódio, 2% de Triton X-100, 100 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mmol/L de EDTA). A suspensão foi transferida para um novo tubo cônico de 1,5 mL contendo 300 mg de pérolas de vidro e este foi agitado por 2 min em agitador de tubos tipo vórtex (Phonex AP56). Após a agitação, foram adicionados ao tubo 200 µL de uma solução

fenol-clorofórmio (1:1, v/v), e este foi agitado levemente para homogeneização da amostra. Após nova centrifugação por 5 min a 13.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL etanol gelado. O tubo foi então mantido a -20 °C por 12 h para precipitação do DNA. Após este período, o tubo foi centrifugado por 5 min a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem da amostra, à temperatura ambiente, esta foi ressuspensa em 50 µL de Tampão TE pH 8,0 (1 mmol/L de EDTA, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0) e armazenada a -20 °C até o momento do uso. A densidade óptica das amostras a 260 e 280 nm foi determinada para medida da concentração do DNA e pureza, respectivamente.

4.3.2 Amplificação da região D1/D2 do rDNA 26S e da região ITS1-ITS2 do rDNA

A região D1/D2 do rDNA das leveduras isoladas foi amplificada pela reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os iniciadores NL1- (5'GCATATCAAGCGGAGGAAAAG3') e NL-4 (5'-GTCCGTGTTTCAAGACGG3') como descrito por Lachance *et al.* (1999). A região ITS 1 e ITS2 do DNA ribossomal foi amplificada por PCR usando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) como descrito por White *et al.* (1990). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: cada 50 µL da mistura continha 50 a 300 ng de DNA, 5 µL de Tampão de PCR com (NH₄)₂SO₄ 10X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ a 25 mmol/L; 2 µL do mix dNTP a 10 mmol/L (Amresco); 2 µL de cada iniciador a 10 µmol/µL e 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas). O volume de cada tubo de reação foi completado para 50 µL com água Milli-Q estéril. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (Mg Reserch, Inc), utilizando-se o seguinte ciclo de reações: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 15 s a 95 °C para desnaturação, 25 s a 54 °C para anelamento dos iniciadores e 20 s a 72 °C para síntese, repetidos por 35 vezes, seguidos de extensão final de 10 min a 72 °C. As amostras amplificadas foram mantidas a 4 °C até o momento do uso. Alíquotas de 5 µL de cada amostra

foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% usando Tampão TBE 0,5% (Tris-borato a 0,045 mmol/L, EDTA 0,001 M pH 8,0), a voltagem constante de 120 V por 25 min. Após a corrida, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio 1 mmol/L e deixado em repouso por 20 min. As bandas foram visualizadas em transluminador com luz ultravioleta a 264 nm.

4.3.3 Sequenciamento

Os produtos obtidos na amplificação das regiões D1/D2 e região ITS1-ITS4 foram purificados com polietilenoglicol (PEG). Cada amostra de DNA foi adicionada de igual volume de PEG (PEG 800 20%, NaCl a 2,5 mol/L) e homogeneizadas em agitador de tubo tipo Vórtex (Phoenix AP56) e incubadas em banho Maria a 37 °C por 15 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 13500 rpm a 4 °C (Eppendorf 5417R). O sobrenadante foi descartado e 125 µL de etanol 80% gelado foram adicionados a cada tubo. A centrifugação e adição de etanol foram repetidas, e após nova centrifugação e descarte do etanol, as amostras foram secas à temperatura ambiente por aproximadamente 1 h. Após a completa secagem das amostras estas foram ressuspensas em 8 µL de água Milli-Q estéril e estocadas a -20 °C até o momento do uso.

As reações de sequenciamento foram realizadas usando o DYEnamic™ (Armstrong Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Electropherogram Quality Analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br>). As seqüências consenso foram analisadas utilizando o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 (*Basic Locus Alignment Search Tool*) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os isolados foram considerados como pertencentes a uma espécie quando apresentaram uma seqüência de nucleotídeos com similaridade \geq a 99% a outra já depositada no *GenBank*. Micro-organismos que apresentaram seqüências com similaridade \leq a 98% na região analisada foram identificadas somente em nível de gênero.

4.4 Extração de compostos surfactantes e emulsificantes da cultura livre de células

Os isolados que apresentaram as maiores taxas de atividade emulsificante foram selecionados para avaliação da capacidade de redução da tensão superficial do meio de crescimento e caracterização química das moléculas tensoativas produzidas.

4.4.1 Crescimento e obtenção da cultura livre de células

As leveduras *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Trichosporon. montevidense* CLOA 70, *T. montevidense* CLOA 70, *Geotrichum sp* CLOA 40 e *T. montevidense* CLOA 72 foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mínimo mineral, acrescido de 20 g/L de óleo de girassol. Os frascos foram incubados sob agitação constante de 200 rpm a 25 °C por até 144 h. Após a incubação, as células das leveduras foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 5000 rpm por 20 min, e o meio livre de células foi preservado sob refrigeração a 4 °C até o momento da medida da tensão superficial e extração dos compostos tensoativos para caracterização química.

4.4.2 Determinação da tensão superficial do meio livre de células

A tensão superficial de cada amostra foi determinada pelo método do anel De Nouy utilizando o tensiômetro KRUSS acoplado com anel de platina de 1,9 cm de diâmetro (K10T, Hamburgo, Alemanha) de acordo com Haba *et al.* (2000). As análises foram realizadas a temperatura ambiente, em três repetições, e comparadas com os valores de tensão superficial do meio mínimo mineral líquido. Os valores de tensão superficial foram expressos em mN/m. A utilização do aparelho foi uma gentileza do Laboratório de Interfaces do Departamento de Engenharia de Minas da Escola de Engenharia da UFMG.

4.4.3 Extração de compostos tensoativos

A extração com acetato de etila foi realizada visando a recuperação de moléculas de baixa massa molecular como glicolipídeos, monoacilgliceróis e lipopeptídeos, e a extração com etanol, visando a recuperação de moléculas de alta massa molecular, preferencialmente proteínas, carboidratos e lipídios.

Cerca de 100 mL da cultura livre de células foram extraídos duas vezes com 10 mL de acetato de etila. Em cada extração, a mistura foi agitada a 200 rpm por 30 min. Posteriormente, as amostras foram transferidas para funil de separação e deixadas em repouso por 1 h. Após este período, a fase inferior foi descartada e a fase orgânica evaporada a temperatura de 50 °C em banho termostaticado por 6 h em capela química. Os extratos recuperados foram pesados e estocados a 4 °C até o momento da detecção da atividade emulsificante e surfactante.

Na precipitação com etanol, amostras de 50 mL de cultura livre de células foram adicionadas de 200 mL de etanol gelado e mantidas sobre refrigeração a 4 °C por 48 h. O precipitado foi recuperado após centrifugação a 5000 rpm por 20 min e lavados duas vezes com 30 mL de clorofórmio-etanol (2:1, v/v) para a remoção do óleo residual. O precipitado recuperado foi submetido à secagem a 60 °C por 3 h. Os extratos recuperados foram pesados e estocados a 4 °C até momento da detecção da atividade emulsificante e surfactante.

4.4.4 Determinação da atividade emulsificante e atividade surfactante

A determinação da atividade emulsificante foi realizada conforme o descrito no item 4.2.2, utilizando os compostos obtidos na concentração final de 5 mg/mL diluídos em água deionizada. A determinação da atividade surfactante dos extratos obtidos foi realizada pelo método do diâmetro da gota descrito por Morita *et al.* (2007), com modificações. Uma amostra foi diluída em água deionizada numa concentração de 5 mg/mL e alíquotas foram adicionadas na superfície de placas de poliestireno (90 X 15 mm) em três repetições. Após 10 min, o diâmetro da gota dispersa sobre a superfície da placa foi medido em mm. O meio mínimo mineral

estéril utilizado para o crescimento dos micro-organismos foi utilizado como controle.

4.4.5 Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes

Os extratos positivos para atividade emulsificante e surfactante foram caracterizados quanto a concentração de carboidratos totais (DUBOIS, 1956), proteínas totais (BRADFORD, 1954), e lipídios pelo método de Piretti *et al.* (1988), com modificações. Neste ensaio, 500 mg do biossurfactante foi adicionado a um frasco de 100 mL com tampa de borracha contendo uma solução de hidróxido de sódio a 5 mol/L em metanol a 95%, o qual foi mantido em banho termostatizado, a uma temperatura de 100 °C por 5 h. Os frascos foram retirados do banho e adicionados de 1 mL de HCl a 37%. Após o resfriamento, uma alíquota de 20 mL de acetato de etila foi adicionada à mistura e levada a agitação de 200 rpm por 15 min. Posteriormente, a fase orgânica foi coletada, e a fase aquosa submetida a uma nova extração com 20 mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram misturadas e evaporadas a uma temperatura de 50 °C. A amostra resultante foi pesada e a concentração de lipídios expressa em porcentagem (%).

4.5. Purificação e caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelos isolados CLV 20, CLOA 40, CLOA 70 e CLOA 72

4.5.1 Purificação parcial do biossurfactante por cromatografia de gel filtração

Para a purificação parcial do biossurfactante por cromatografia de gel filtração, foi utilizada uma coluna (1,6 x 57 cm, Pharmacia K 16/703,5) contendo resina de gel filtração Sepharyl S-200 (Pharmacia). A coluna foi acoplada no sistema Econo System da Bio-Rad (Econo System Controller, Model ES-1, Econo Pump Model EP-1, UV monitor Model EM-1, Fraction Collector Model 2110, Gradient Monitor Model EG-1 e Recorder Model 1325, Hercules, CA, USA) e equilibrada com água deionizada. Uma amostra de 1 mL (20 mg) foi eluída com água deionizada como fase móvel, utilizando um fluxo de 1 mL/min e monitorada

pela medida da absorbância a 280 nm. O volume de eluição foi de 72 mL constituindo um total de 36 frações. As frações coletadas foram avaliadas quanto à concentração de carboidratos totais pelo método fenol-ácido sulfúrico como descrito por Dubois (1956) utilizando glicose como padrão, concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1954) utilizando soro albumina bovino como padrão. As frações ainda foram submetidas a determinação da atividade emulsificante (E_{24}) como descrito no item 4.2.2.

Para a determinação do rendimento da purificação, frações positivas quanto à presença de carboidratos e atividade emulsificante (E_{24}) obtidas de 3 corridas foram liofilizadas e pesadas. A massa obtida foi convertida em porcentagem da massa da amostra aplicada na coluna. Os biossurfactantes purificados também foram submetidos à determinação da presença de proteínas por meio eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS-PAGE). Os compostos presentes na frações positivas foram caracterizadas quanto a composição de ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa como descrito no item 4.5.2 .

4.5.2 Caracterização dos ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa

Para a determinação da composição de ácidos graxos da porção lipídica dos biossurfactantes. Amostras de 10 mg liofilizadas provenientes da Cromatografia de gel filtração Sephacryl S-200 foram submetidos a extração de lipídios pelo método de Piretti *et al.* (1998) como descrito no item 2.5.5. Os ácidos graxos resultantes foram metilados e esterificados a partir de incubação por 15 min a 95 °C em metanol/ BF_3 , utilizando o método descrito por Morrison e Smith (1964).

Os ácidos graxos foram analisados em um Cromatógrafo a Gás Varian CP3380 (coluna capilar CP-Sil 88, 50m; temperatura de 170 °C a 250 °C e detector de ionização de chama). Os ácidos graxos foram identificados de acordo com o tempo de retenção dos padrões de ésteres de ácidos graxos (TM 37, FAME, mix 47885, Sulpeco, USA). As quantidades relativas em porcentagem dos ácidos graxos foram determinadas a partir das áreas dos picos dos ésteres de ácidos graxos metilados detectados após a ionização.

Os monossacarídeos presentes nos biossurfactantes foram identificados por cromatografia gasosa após transformação em alditóis acetatos. A amostra de 1 mg de cada biossurfactante foi hidrolisada com 150 μ L de ácido trifluoroacético (2 mol/L), a 120 °C por 4 h. Após evaporação, o resíduo foi lavado duas vezes com metanol e reduzido com 100 μ L de borohidreto de sódio aquoso (1 mol/L) e acetilada com uma mistura de acetato de potássio (100 mg) e ácido acético (100 μ L) a 100 °C por 2 h. O excesso do reagente foi removido por evaporação e, em seguida, as amostras foram lavadas várias vezes com etanol. Os alditóis acetatos foram extraídos com acetato de etila e água (1:1, v:v) e analisados por CG-EM (Shimadzu, modelo QP 5050 A) equipado com coluna TEP-5-Supelco (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μ m de filme de espessura) utilizando gás hélio como gás de arraste. Temperatura da coluna foi programada a partir de 100 °C (1 min) seguidos de acréscimos de 4 °C/min até atingir 200 °C, seguido de um gradiente de 20 °C/min até atingir 300 °C, temperatura que foi mantida por 5 min. As identificações dos açúcares foram baseadas nos padrões internos dos açúcares: glicose, manose, galactose, ramnose, fucose, ribose, arabinose e xilose (Supelco E.U.A).

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Os biossurfactantes recuperados por fracionamento em cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Para tanto, 5 μ L da amostra de cada biossurfactante na concentração de 5 μ g/ μ L foi diluída (1:2) em tampão Tris-HCl 0,125 mol/L, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de bromofenol e incubada em banho-maria a 100 °C por 3 min. Para referência de peso molecular foram utilizados os seguintes marcadores moleculares: 200 KDa (Miosina), 116 KDa (β -galactosidase), 97 KDa (Fosfolipase), 66 KDa (Albumina), 29 KDa (Anidrase carbônica). Cada amostra foi aplicada em uma canaleta do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (empacotamento 4% e resolução 10%) e submetida à diferença de potencial de 15 mA. Após a corrida, o gel foi fixado em metanol 50% e corado pelo método de Blum *et al.* (1987).

4.6 Cinética de crescimento e produção dos biossurfactantes pelos isolados CLV 20, CLOA 40, CLOA 70 e CLOA 72

O inóculo foi preparado a partir de células de *T. loubieri* CLV20, *Geotrichum* sp. CLOA40, *T. montevidense* CLOA70 e *T. montevidense* CLOA72 incubadas em meio Sabouraud sólido por 48 h a 25 °C, e lavadas com solução salina (NaCl 0,85, p/v). Após a lavagem, as células foram ressuspensas em tubos plásticos de 50 mL contendo 20 mL de meio MM. Leituras da densidade ótica a 600 nm foram realizadas e os valores obtidos foram utilizados para a determinação do volume a ser transferido aos frascos de ensaio de modo a obter uma concentração final de 0,02 D.O, correspondente ao valor de Log_{10} ufc/mL de 3,32.

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo mineral adicionado de 20 g/L de óleo de girassol. Os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação contínua de 180 rpm por até 144 h. Amostras foram removidas em diferentes intervalos de tempo para determinação da concentração celular, produção do biossurfactante, taxa de produção volumétrica e atividade emulsificante. Os ensaios foram realizados em três repetições.

Para avaliação da concentração celular, alíquotas foram retiradas, diluídas serialmente e plaqueadas em meio Sabouraud sólido para a determinação de ufc/mL, e os valores obtidos convertidos em Log_{10} de ufc/mL.

Para a determinação da produção do biossurfactante, amostras de 40 mL foram retiradas e centrifugadas a 5000 rpm por 20 min, o sobrenadante foi adicionado de 4 volumes de etanol e mantido por 48 h a 4°C para a precipitação do biossurfactante. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 5000 rpm por 20 min, e lavado por 2 vezes com clorofórmio-metanol (1:2, v/v) para retirada de óleos residuais, e novamente centrifugado. O precipitado foi seco até obtenção de peso constante em estufa a 60 °C, e os valores obtidos utilizados para o cálculo de produção em g/L e taxa de produção volumétrica (g/L/h). Amostras do sobrenadante foram também avaliadas quanto à atividade emulsificante pelo índice de emulsificação (E_{24}) como descrito no item 4.2.2. Os ensaios foram realizados em três repetições.

4.7 Determinação da hidrofobicidade celular dos isolados CLV 20, CLOA 40, CLOA 70 e CLOA 72 após incubação em meio contendo óleo de girassol

A hidrofobicidade da superfície celular foi determinada pelo método de adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH). Os ensaios foram conduzidos como descrito por Rosenberg *et al.* (1980), utilizando células dos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72 crescidas em MM adicionado de óleo de girassol e células crescidas por 144 h e células crescidas em meio Sabouraud (tempo zero). Após a centrifugação a 5000 rpm por 10 min a 4°C, as células foram lavadas duas vezes com tampão PUM (22,2 g de K₂HPO₄.4H₂O; 7,26 g de KH₂PO₄; 1,8 g de uréia e 0,2 g de MgSO₄.7H₂O em 1 L de água destilada, pH 7,2), e ressuspensas neste tampão de forma a se obter a concentração de 1,0 unidade de densidade óptica a 600 nm (D.O inicial), esta concentração foi padronizada utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV 120. Alíquotas de 2 mL da suspensão celular e de 0,5 mL de n-hexadecano foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex (Phoenix AP56) em velocidade máxima por 2 min. Após 10 min de repouso, as amostras de 1 mL da fase aquosa foram removidas e submetidas à determinação da densidade óptica a 600 nm (D.O final). Os ensaios foram realizados em triplicata. A hidrofobicidade foi estimada pelo cálculo da porcentagem das células aderidas ao hexadecano, por meio da fórmula:

$$\% \text{ células aderidas ao hexadecano} = [(D.O. \text{ inicial} - D.O. \text{ final}) / D.O. \text{ inicial}] \times 100$$

4.8 Efeito de várias fontes de carbono no crescimento e atividade emulsificante de *Trichosporon montevidense* CLOA 72

A levedura *T. montevidense* CLOA 72 foi submetida a estudos de crescimento em diferentes fontes de carbono e determinação da atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E₂₄).

4.8.1 Obtenção do inóculo

As células foram inoculadas em placas contendo meio Sabouraud sólido e incubadas por 48 h a 25 °C. Após o crescimento, colônias foram retiradas com o auxílio de alça metálica e ressuspensas em tubos plásticos de 50 mL, contendo 20 mL de meio mínimo mineral. A suspensão de células foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo meio mínimo mineral a fim de se obter uma densidade ótica final de 0,02 O.D a 600 nm.

4.8.2. Ensaios

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio mínimo mineral adicionado das seguintes fontes de carbono: 20 g/L de óleo de girassol, 20 g/L de glicose, 20 g/L de sacarose ou 20 g/L de glicerol. Os frascos foram incubados a 25 °C sob agitação contínua de 150 rpm por até 96 h. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 h para a determinação do crescimento celular e atividade emulsificante. O crescimento celular foi monitorado pela medida da densidade ótica a 600 nm. Para a determinação da atividade emulsificante (E_{24}), foram utilizados os sobrenadantes das amostras após centrifugação a 5000 rpm por 20 min. Os ensaios foram realizados em três repetições.

4.9 Caracterização do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA 72

O biossurfactante produzido durante o crescimento de *T. montevidense* CLOA 72 como descrito no item 4.4 foi utilizado em estudos de atividade emulsificante como: variação na concentração, variação de pH, variação da temperatura; estabilidade da emulsão na presença de eletrólitos, na presença de

diferentes substratos hidrofóbicos, efeito de temperaturas diferentes na estabilidade da atividade emulsificante, e determinação da CMC (concentração micelar crítica) após dissolução de em água.

4.9.1 Determinação do efeito da concentração do biossurfactante produzido na atividade emulsificante

Para determinação do efeito da concentração do biossurfactante na atividade emulsificante, o biossurfactante foi diluído em água deionizada nas concentrações de 0,19 a 15 mg/mL, que foram utilizadas para determinação da atividade emulsificante, utilizando o método do índice de emulsificação (E_{24}) descrito por CAMERON *et al.* (1988). Nestes ensaios, amostras de 4 mL da cultura livre de células filtradas em membrana de nitrocelulose de 0,45 μm de diâmetro de poro foram adicionadas a tubos com tampa rosqueável contendo 6 mL de tolueno. Cada tubo foi submetido à homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h. O índice de emulsificação foi determinado de acordo como descrito no item 4.2.2. Os ensaios foram realizados em três repetições.

4.9.2 Estudo da atividade emulsificante em diferentes valores de pH

Para estudar o efeito do pH na atividade emulsificante, o biossurfactante (20 mg/mL) foi dissolvido nos tampões cloreto de potássio-HCl na concentração de 200 mmol/L, para pH 1 e 2, acetato de sódio-ácido acético na concentração de 200 mol/L para pH 3, 4 e 5, fosfato de sódio na concentração de 100 mmol/L para pH 6, 7 e 8, e glicina-NaOH na concentração de 200 mmol/L para pH 9 e 10. A atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (E_{24}).

4.9.3 Estudo de estabilidade do biossurfactante após exposição a 100 °C

Os ensaios foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 20 mg/mL em fase aquosa. Amostras de 4 mL foram transferidas para tubos de tampa rosqueável e incubados por 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min a uma temperatura de 100 °C. Após a incubação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e adicionados de 6 mL de tolueno para a formação das emulsões. A atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (E_{24}).

4.9.4 Determinação da atividade emulsificante em diferentes substratos hidrofóbicos

Os ensaios foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 20 mg/mL em água deionizada. Amostras de 4 mL foram transferidas para tubos de tampa rosqueável e acrescidos de 6 mL dos seguintes substratos hidrofóbicos: hexadecano (VETEC), ciclohexano (VETEC), hexano (VETEC), isooctano (VETEC), óleo diesel (Petrobras, Brasil), querosene, óleo mineral, ácido oléico (VETEC), óleo de algodão (BUNGE-alimentos), óleo de girassol (BUNGE-alimentos) e tolueno (VETEC). Os tubos foram submetidos à agitação em agitador de tubos tipo Vortex por 2 min, e após 24 h a atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (E_{24}).

4.9.5 Estudo de estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante após exposição a 4 °C e 37 °C

Os ensaios foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 20 mg/mL em água deionizada. Amostras foram transferidas para tubos de vidro (1,5 X 15 cm) de tampa rosqueável e acrescidas de 6 mL de óleo de girassol como

substrato hidrofóbico. As emulsões foram formadas como descrito no item 2.2. O óleo de girassol foi escolhido para este ensaio por não apresentar evaporação a 37 °C ao contrário do tolueno. Após 24 h de repouso, as emulsões foram incubadas a 4° C e 37 °C por 30 dias. Após o período considerado, a atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (E_{24}).

4.9.6 Estudo de estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante após adição de eletrólitos

Os ensaios foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 20 mg/mL. Amostras de 4 mL foram adicionadas a tubos de vidro (1,5 X 15 cm) de tampa rosqueável e acrescidas de 6 mL de tolueno, sendo as emulsões formadas como descrito no item 2.2. Após 24 h de repouso, três eletrólitos em diferentes quantidades foram adicionados às emulsões. Foram utilizados os sais cloreto de sódio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio nas quantidades de 800, 1000, 1200, 1400, 2000 e 3000 mg. Os tubos foram submetidos à agitação em agitador tipo vortex por 2 min, e após 24 h, a atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (E_{24}).

4.9.7 Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC foi determinada pela plotagem da tensão superficial (mN/m) em função da concentração do biossurfactante (mg/mL) produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA 72 e considerando a CMC como o ponto onde a inclinação da curva muda abruptamente (MULLIGAN, 2005). Soluções aquosas do biossurfactante nas concentrações de 0,1 a 24 mg/mL foram preparadas a partir do extrato bruto obtido por precipitação com etanol e utilizadas para a determinação das medidas de tensão superficial pelo método do anel De Nouy De Nouy utilizando o tensiômetro KRUSS acoplado com anel de platina de 1,9 cm de diâmetro (K10T, Hamburgo, Alemanha) de acordo com Haba *et al.* (2000).

4.10 Utilização dos biossurfactantes na redução da formação de biofilmes de *C. albicans* em superfícies de placas de poliestireno

Para os ensaios de inibição da formação de biofilmes foram utilizados os biossurfactantes produzidos pelos isolados *T. loubieri* CLV20, *Geotrichum* sp CLOA40, *T. montevidense* CLOA70 e *T. montevidense* CLOA72. Os ensaios de formação de biofilme foram realizados conforme descrito por Li *et al.* (2003). Neste teste foi utilizado 1 isolado de *Candida albicans* CC obtido de canal radicular de dente com necrose pulpar isolado e identificado por Miranda (2007), e depositado na coleção de Micro-organismos do Laboratório de Mecanismos de Infecções Fúngicas (ICB-UFMG).

4.10.1 Preparo das suspensões celulares de *Candida albicans*

O isolado de *C. albicans* CC foi crescido em meio Sabouraud sólido a 37 °C por 48 h. As células foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose). Os frascos foram incubados por 24 h sob agitação constante de 150 rpm a 37 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, e lavadas duas vezes com 40 mL de solução salina tamponada em fosfato (PBS). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO) suplementado com L-glutamina e tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico- Sigma, St Louis, MO] na concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0, e ajustadas a uma densidade óptica de 1.0 a 600 nm utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV 120.

4.10.2 Ensaios

Para a realização dos ensaios de formação de biofilmes, foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços de poliestireno não tratado (Cral® Produto N°

3896) seguindo a metodologia descrita por Li et al. (2003). Alíquotas de 100 µL da suspensão celular ($D.O_{600}$ 1,0), acrescidas dos biossurfactantes purificados por fracionamento por cromatografia de gel filtração Sephacryl S-200, como descrito no item 4.5 em concentrações crescentes (0,5 a 16 mg/mL), foram transferidas para os poços das placas, em 3 repetições. Suspensões celulares em meio RPMI-MOPS e sem acréscimo do biossurfactante foram utilizadas como controle em 3 repetições. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para a formação dos biofilmes.

Após a incubação, o meio foi descartado e os poços foram lavados levemente por 3 vezes com salina tamponada em fosfato (PBS-pH 7,2) para a remoção das células não aderidas. Posteriormente, procedeu-se a fixação dos micro-organismos aderidos com 200 µL de metanol a 99% por 15 min. Após a fixação, as placas foram lavadas com água destilada por 3 vezes e secas por 30 min a temperatura ambiente. A seguir, cada poço foi adicionado de 200 µL de cristal violeta a 2%, incubadas por 5 min, lavadas vigorosamente com água destilada para remover o excesso do corante, e secas por 30 min a temperatura ambiente. A seguir, o corante ligado às células aderidas foi removido com 200 µL de etanol 99% (P.A). A solução foi transferida para uma nova placa de 96 poços e submetidas à leitura de absorbância em leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como o percentual de alteração na absorbância em relação ao controle, que constitui de células incubadas sem adição de biossurfactante.

4.11 Determinação da hidrofobicidade celular durante a formação de biofilmes por *C. albicans* na presença de biossurfactante

Para determinar as alterações na hidrofobicidade da superfície celular da levedura *C. albicans* após incubação na presença do biossurfactante purificado foi utilizado o ensaio de adesão microbiana a hidrocarboneto (MATH) proposto por ROSENBERG *et al.* (1980), com modificações. O biofilme de *C. albicans* foi formado sobre a superfície de placas de poliestireno de 6 poços após a adição de meio RPMI contendo 4 mg/L do biossurfactante. Após a incubação a 37 °C por 24 h

as placas foram lavadas com 5 mL salina tamponada em fosfato por 2 vezes para retirar as células não aderidas. O biofilme formado foi retirado levemente com uma espátula e depois ressuspensionado em 10 mL salina tamponada em fosfato. A amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4 °C, e as células foram lavadas duas vezes com tampão PUM pH 7,2 (22,2 g de K₂HPO₄.4H₂O; 7,26 g de KH₂PO₄; 1,8 g de Uréia e 0,2 g de MgSO₄.7H₂O). A seguir, as células foram ressuspensionadas neste tampão de forma a se obter a concentração de 0,3 unidade de densidade óptica a 600 nm, esta concentração foi padronizada utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV 120. Alíquotas de 2 mL da suspensão celular e de 0,5 mL de hexadecano foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix AP56) em velocidade máxima por 2 min. Após 10 min de repouso, amostras de 1 mL da fase aquosa foram removidas e submetidas à determinação da densidade óptica a 600 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A hidrofobicidade foi estimada pelo cálculo da porcentagem das células aderidas ao hexadecano, por meio da fórmula:

$$\% \text{ células aderidas ao hexadecano} = [(D.O. \text{ inicial} - D.O. \text{ final}) / D.O. \text{ inicial}] \times 100$$

4.12 Determinação do efeito do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevideense* CLO72 na redução do crescimento de *C. albicans*

4.12.1 Preparo das suspensões celulares

O isolado foi crescido em meio agar Sabouraud dextrose a 37 °C por 24 h. Após a incubação, colônias do isolado foram transferidas para tubos cônicos contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%). As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, o procedimento foi repetido por 2 vezes. Após a centrifugação as células foram ressuspensionadas em meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO) suplementado com L-glutamina e tampão MOPS 0,165 mol/L [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico- Sigma, St Louis, MO. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min e lavadas duas vezes com 40 mL de salina tamponada em fosfato (PBS). As células foram ressuspensionadas em meio RPMI. A densidade óptica das células foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu UV 120 e ajustada para 1,0 D.O utilizando uma absorbância de 600 nm.

4.12.2 Ensaios

Alíquotas de 4 mL das suspensões obtidas (O.D₆₀₀ 1,0) foram adicionadas em tubos plásticos estéreis de 15 mL. O biossurfactante obtido por fracionamento em cromatografia de gel filtração Sephacryl S-200 foi utilizado nas concentrações de 0,130 a 16 mg/mL, em três repetições. Os tubos foram incubados a 37 °C por 20 h sob agitação constante de 150 rpm. Após a incubação, alíquotas foram retiradas, diluídas serialmente e plaqueadas em meio Sabouraud sólido para a determinação da concentração celular expressa em Log₁₀ de ufc/mL. Os valores obtidos foram comparados com os controles crescidos em meio RPMI sem adição de biossurfactante para o cálculo da porcentagem de redução do crescimento celular.

4.13 Calorimetria Isotérmica de Titulação

A calorimétrica isotérmica de titulação (ITC) foi realizada a fim de caracterizar a termodinâmica do complexo constituído pelo biossurfactante e as células de *C. albicans* em suspensão. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando um VP-ITC Microcalorimeter da Microcal, a 298,15 K. As titulações consistiram de 51 injeções sucessivas (com intervalos de tempo de 300 s) de 5 µL de solução aquosa de biossurfactante (13 mg/mL) em 1,5 mL de suspensões celulares de *C. albicans* (O.D₆₀₀ 1.0).

Uma injeção inicial de 1 µL foi descarregada a fim de eliminar os efeitos da difusão de biossurfactante da ponta da seringa para o meio, durante o processo de pré-equilíbrio. A concentração de biossurfactante dentro da célula variou de 0 a ≈ 0,37 mg/mL, enquanto a concentração das células de *C. albicans* (expressa em termos de O.D₆₀₀) variou de 1 O.D a 0,86 O.D. A correção da concentração bem como a integração dos picos de fluxo de calor envolvidos na entalpia específica do Kcal/mg do biossurfactante foram feitas com o software Microcal Origin 5.0 para ITC. Experimento controle, referente a injeções de células de *C. albicans* sem adição de biossurfactante, e injeções do biossurfactante em solução aquosa foram feitos para determinar uma possível liberação de energia durante os ensaios de diluição.

4.14 Efeito do biossurfactante no potencial zeta (ZP) da superfície celular de *C. albicans*

Os experimentos de Potencial Zeta foram conduzidos a 25 °C, utilizando com Zetasizer NanoZS m (Malvern) com 64 canais e correlator de 633 nm (red Lazer). A técnica utilizada para a medida de ZP foi conduzida de acordo com padrões Malvern *Laser Doppler Velocimetry* acoplado com M3-PALS (*Phase Analysis Light Scattering*).

As suspensões celulares foram adicionadas em cubetas de polietileno com 1 cm de caminho óptico acoplada a elétrodos (Malvern, *Folded Capillary cell-DTS1060*). O ensaio foi processado por titulação, por meio de 51 injeções manuais de 10 µL de solução aquosa do biossurfactante (13 mg/mL) em recipiente de 25 mL contendo suspensões de células de *Candida albicans* (O.D₆₀₀ 1.0), de modo que as condições fossem as mais próximas possíveis daquelas descritas no experimento de ITC. A cada titulação, a solução foi transferida para uma cubeta (*Folded Capillary cell*), e a carga líquida foi então determinada. Cada ponto de ZP correspondeu a 5 médias de dez execuções.

4.15 Avaliação do efeito citotóxico do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA 72 em células embrionárias de rim humano HEK 293A

Os ensaios de citotoxicidade do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 foram conduzidos utilizando células embrionárias de rim de macaco HEK 293A cedidas gentilmente pelo laboratório de Agentes Recombinantes (ICB-UFMG). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 50 mL contendo 10 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 5mol/L de bicarbonato de sódio, 25 mmol/L de HEPES e 40 mg/L. As garrafas foram incubadas por 24 h a 37 °C com 5% de CO₂. Após o crescimento das células, alíquotas 100 µL da cultura foram transferidas para poços de placas de 96 poços a uma concentração de 10⁵ células/poço. As placas contendo as células foram então mantidas nas mesmas condições como descrito anteriormente. Após 24 h de incubação, concentrações

crescentes de 0,25 a 15 mg/mL do biossurfactante foram adicionadas aos poços das placas, que foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os controles consistiram de células adicionadas do meio de crescimento DMEM sem adição do biossurfactante.

Após a incubação, uma alíquota de 10 µl de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a 5 mg/mL em tampão fosfato pH 7,0 foi adicionada em cada poço e as placas incubadas por 4 h a 37° C e 5% de CO₂. Após a incubação, 100 µL de uma solução de lise consistindo de SDS 10% e 50% de dimetilformamida foram adicionadas a cada poço. As amostras foram homogeneizadas para uma completa dissolução dos cristais de formazan. O conteúdo de cada poço das placas foi submetido à determinação da absorbância no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram calculados a partir da medida da absorbância utilizando a fórmula $[1 - (Abs_{exp}/Abs_{contr})] \times 100$, com porcentagem da medida da absorbância das células tratadas com o biossurfactante em relação ao controle de células sem adição de biossurfactante. As amostras foram testadas em duplicata. A EC₅₀ (concentração efetiva que mata 50% das células) foi calculada a partir dos dados obtidos das medidas da redução da absorbância (%) utilizando o programa Prisma 4.0 software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

4.16 Ensaio de inibição da adesão de *C. albicans* em células epiteliais bucais pelo biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA 72

Para os ensaios de inibição de adesão em células epiteliais bucais, foi utilizado uma linhagem de *C. albicans* 18 isolado da cavidade bucal de paciente com prótese total que foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Micologia ICB-UFMG, o qual foi selecionado por possuir uma alta capacidade adesiva em células epiteliais bucais (LYON, 2006). As células de *C. albicans* foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Sabouraud líquido. Os frascos foram incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, e lavadas com 40 mL de solução salina tamponada em fosfato (PBS) por três vezes. As células foram ressuspensas em meio Sabouraud líquido, numa concentração celular de 1×10^7 células/mL padronizada com auxílio de uma câmara de Neubauer.

4.16.1 Ensaios de adesão

O método de aderência proposto por Kimura e Pearsall (1978) modificado foi utilizado para a preparação das células epiteliais bucais (CEB) para o teste de adesão. Células bucais humanas de adultos jovens saudáveis foram coletadas pela manhã, no mesmo horário, com o auxílio de dois swabs estéreis e transferidas para tubos 15 mL contendo 10 mL de tampão PBS pH 7,2. A suspensão de CEB foi lavada três vezes em PBS estéril (3000 rpm por 10 min) para a remoção de partículas aderidas. As CEB foram então suspensas em meio Sabouraud líquido a uma concentração de 10^5 células/mL, contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer e utilizadas imediatamente nos testes de adesão.

Para o teste, alíquotas de 0,25 mL de suspensões células de *C. albicans* foram misturadas com alíquotas de 0,25 mL de suspensões de células epiteliais bucais (CEB) em tubos plásticos de microcentrífuga de 2 mL. As suspensões foram adicionadas de concentrações crescentes do biossurfactante produzido pela levedura *T. montevidense* CLOA72 (0,25 a 16 mg/mL). Este biossurfactante foi escolhido por ser o mais efetivo na inibição da formação de biofilmes de *C. albicans* em superfície de placas de poliestireno. Os tubos foram incubados sob agitação de 70 rpm a 37 °C por 1 h. Após a incubação, as suspensões celulares leveduras/células epiteliais foram adicionadas em 4 mL de tampão fosfato filtradas sob pressão negativa em membranas de policarbonato com 12- μ m de diâmetro de poro (Millipore, UK).

A seguir, as membranas foram lavadas com 100 mL de tampão fosfato para remover as células de *C. albicans* não aderidas à CEB. O filtro foi retirado com auxílio de uma pinça, e pressionado contra uma lâmina de vidro para a transferência das células. As lâminas contendo as membranas foram então secas por 20 min em capela de fluxo laminar. Após a secagem, as membranas foram retiradas, e as lâminas foram fixadas em etanol 99% por 10 min, lavadas com água destilada e coradas com cristal violeta 1% por 2 min. O número de leveduras aderidas a 50 CEB foi determinado sob visualização das lâminas em microscópio óptico (400 X). Células (CEB) dobradas ou sobrepostas foram excluídas da contagem.

4.17 Determinação da hidrofobicidade celular de *C. albicans*

Para determinar as alterações na hidrofobicidade da superfície celular da levedura *C. albicans* 18 (10^5 células/mL) após incubação na presença do biossurfactante purificado (16 mg/mL) em meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO) suplementado com L-glutamina e tampão MOPS 0,165 mol/L [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico- Sigma, St Louis, MO], foi utilizado o ensaio de adesão microbiana a hidrocarboneto (MATH) proposto por ROSENBERG *et al.* (1980) com modificações. Após a incubação a 37 °C por 24 h as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4 °C e lavadas duas vezes com 10 mL de tampão PUM pH 7,2 (22,2 g $K_2HPO_4 \cdot 4H_2O$; 7,26 g KH_2PO_4 ; 1,8 g Uréia e 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e ressuspensas neste tampão de forma a se obter a concentração de 0,3 unidade de densidade óptica a 600 nm (D.O inicial), esta concentração foi padronizada utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV 120. Alíquotas de 2 mL da suspensão celular e de 0,5 mL de hexadecano foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix AP56) em velocidade máxima por 2 min. Após 10 min de repouso, as amostras de 1 mL da fase aquosa foram removidas e submetidas à determinação da densidade óptica a 600 nm (D.O final). Os ensaios foram realizados em três repetições. A hidrofobicidade foi estimada pelo cálculo da porcentagem das células aderidas ao hexadecano, por meio da fórmula:

$$\% \text{ células aderidas ao hexadecano} = [(D.O. \text{ inicial} - D.O. \text{ final}) / D.O. \text{ inicial}] \times 100.$$

4.18 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos biossurfactantes contra células de *C. albicans*

A concentração inibitória mínima foi determinada utilizando o isolado de *C. albicans* 18. O isolado foi crescido em meio agar Sabouraud dextrose a 37 °C por 24 h. Após a incubação, colônias do isolado foram transferidas para tubos cônicos contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%). As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, o procedimento foi repetido por 2 vezes. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina e tampão MOPS 0,165 mol/L.

Uma suspensão de células de *C. albicans* 18, na concentração de 10^3 células/mL foi inoculada em poços de placa de 96 poços para microtítulo contendo biossurfactante nas concentrações de 0,1 a 25 mg/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h. Os controles consistiram de células dos isolados de *C. albicans* 18 adicionadas do meio de crescimento RPMI-MOPS sem adição de biossurfactante. Após a incubação as placas foram submetidas à leitura seguindo as recomendações apresentadas pelo documento M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, anteriormente denominado NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS, 2002). Paralelamente aos ensaios de determinação da concentração inibitória mínima, as suspensões celulares de *C. albicans* 18 nos poços foram submetidas à determinação de absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

4.19 Análises estatísticas

Quando necessário os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Prisma 4.0 software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Na ANOVA, foi avaliada a ocorrência de interação entre os fatores (tipo e concentração do biossurfactante) fazendo seu desdobramento. As análises foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR (UFLA). Os resultados foram expressos em termos da média aritmética de três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tuckey com o nível de significância entre 0,001 a 0,05. Por sua vez, para verificar a associação entre as variáveis, utilizou-se o coeficiente de correlação linear Produto-Momento de Pearson. Foi adotado o índice de significância de 5% no programa estatístico Sigma Stat 3.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento das leveduras e detecção da atividade emulsificante produzida pelos isolados

Cento e trinta e dois isolados de leveduras foram obtidos pela técnica de enriquecimento a partir de amostras coletadas em um sistema de tratamento de efluentes de uma indústria de laticínios, situada na região metropolitana de Belo Horizonte. Trinta e um isolados foram provenientes da lagoa de aeração (CLA), 72 do tanque de lodo ativado (CLOA) e 29 da lagoa de vazão (CLV).

Os isolados de leveduras foram avaliados quanto à capacidade de crescer em meio mínimo mineral contendo óleo de girassol na concentração de 2% como fonte principal de carbono. Foi observado que 50 isolados apresentaram crescimento, com densidade celular acima de 12 unidades de Densidade óptica (D.O) a 600 nm após 7 dias de crescimento. Estes foram selecionados para a avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por meio de detecção de atividade emulsificante (E_{24}).

Dos 50 (Cinquenta) isolados selecionados para o teste de emulsificação, 32 apresentaram atividade emulsificante estável por mais de 24 h (tabela 1). Destes 32 isolados, doze apresentaram atividade emulsificante por dois meses de incubação, com valores entre 7,32% a 78,52%. Entretanto, somente as emulsões formadas a partir das culturas livres dos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72 apresentaram estabilidade após 2 meses de incubação, sem alterações significativas do índice de emulsificação (E_{24}). Os maiores valores de índice de emulsificação foram detectados para o isolado CLOA72, cujo valor foi de 78,92% em 24 h e 78,52% após dois meses. Para os isolados CLV20, CLOA40 e CLOA70, os índices de emulsificação para 24 h e 2 meses foram 75,60%/ 71,29%, 77,78%/ 77,45%, 66,87/ 65,80%, respectivamente.

A utilização de óleos vegetais e efluentes contendo compostos oleosos como substratos de crescimento e produção de biossurfactantes por leveduras e bactérias têm sido bastante empregados, com intuito de diminuir o custo de produção destas moléculas. De acordo com este nosso estudo, a adição de óleo de girassol no meio

de crescimento é capaz de estimular a produção de agentes emulsificantes. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos citados na literatura, que relatam a produção de biossurfactantes por leveduras e bactérias durante o crescimento em meios adicionados de óleos vegetais. Haba *et al.* (2000) relataram a utilização de óleo de girassol para a produção de biossurfactante do tipo glicolípido por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044. Também, a utilização de óleo de soja se mostrou eficaz para estimular a produção de grandes quantidades do biossurfactante manosileritritol-lipídeos por *Pseudozyma aphidis* DSM 14930 (RAU *et al.*, 2005).

Tabela 1- Estabilidade da atividade emulsificante utilizando os meios de culturas de leveduras livres de células

Isolados	Crescimento (O.D)	Ín.de emulsificação ¹ (E ₂₄) ¹	Ín. de emulsificação ² 2 meses	Isolados	Crescimento (O.D)	Ín.de emulsificação (E ₂₄) ¹	Ín. de emulsificação 2 meses
CLV 7	12,5 ± 1,2	14,14 ± 0,79	7,32 ± 0,06	CLA 30	19,5 ± 0,22	44,61 ± 0,85	-
CLV 9	13,2 ± 0,8	36,27 ± 0,85	14,71 ± 0,00	CLA 40	13,6 ± 0,34	45,10 ± 0,85	-
CLV 10	14,2 ± 0,5	61,57 ± 0,33	16,25 ± 0,72	CLOA 7	18,2 ± 0,46	71,08 ± 0,00	-
CLV 11	15,3 ± 0,66	63,73 ± 0,85	35,29 ± 0,85	CLOA 8	14,3 ± 1,31	18,03 ± 0,85	-
CLV 14	14,3 ± 0,57	42,65 ± 1,47	-	CLOA 10	17,3 ± 0,64	58,82 ± 0,85	-
CLV 15	12,5 ± 0,44	36,27 ± 0,20	-	CLOA 16	13,8 ± 0,53	59,31 ± 0,85	-
CLV 17	13,7 ± 1,1	38,73 ± 0,85	22,06 ± 1,70	CLOA 18	12,4 ± 0,27	45,10 ± 0,82	35,78 ± 0,82
CLV 20	15,6 ± 1,4	75,60 ± 0,85	71,29 ± 0,24	CLOA 19	13,7 ± 1,4	44,61 ± 0,85	31,86 ± 0,00
CLV 24	14,8 ± 0,4	43,14 ± 0,85	35,29 ± 0,85	CLOA 20	17,6 ± 0,92	44,12 ± 0,85	-
CLV 26	16,4 ± 0,47	44,61 ± 0,85	-	CLOA 22	13,7 ± 0,64	37,25 ± 0,85	-
CLA 1	17,3 ± 0,36	36,27 ± 0,65	-	CLOA 23	12,3 ± 0,44	37,75 ± 0,85	-
CLA 2	13,7 ± 0,38	22,44 ± 0,85	-	CLOA 27	14,6 ± 0,60	18,14 ± 0,85	-
CLA 7	13,4 ± 0,84	29,90 ± 0,74	-	CLOA 40	17,6 ± 1,2	77,78 ± 0,82	77,45 ± 0,82
CLA 8	14,7 ± 0,37	58,05 ± 1,22	-	CLOA 70	15,8 ± 0,43	66,67 ± 0,85	65,80 ± 0,00
CLA 10	15,4 ± 0,56	66,35 ± 1,25	-	CLOA 71	16,3 ± 0,30	59,31 ± 0,85	-
CLA 11	15,3 ± 0,76	56,74 ± 0,85	29,54 ± 0,49	CLOA 72	17,6 ± 1,25	78,92 ± 0,85	78,52 ± 0,85

1- Índice de emulsificação após 24 h (E₂₄) do meio livre de células. 2-Índice de emulsificação após 2 meses do meio livre de células.

5.2 Identificação das leveduras isoladas

As linhagens de leveduras obtidas foram analisadas com base em critérios morfológicos e bioquímicos definidos como metodologia padrão (YARROW, 1998), incluindo a capacidade de crescer em diferentes fontes de carbono e nitrogênio e em diversas condições de incubação (Anexo 1). Baseando na similaridade dos perfis fisiológicos, os isolados foram agrupados em 10 grupos, sendo que alguns puderam ser identificados no nível de gênero. Com os resultados obtidos, não foi possível a identificação de alguns isolados no nível de espécie, ou até mesmo gênero, o que foi realizado, então, por sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do RNA ribossomal. Quando as seqüências obtidas não foram suficientes para a identificação da levedura, foram analisadas também seqüências obtidas de PCR com os iniciadores ITS-1 e ITS4 (WHITE, 1990). Os resultados da identificação de todos os isolados estão apresentados na tabela 2

Após o sequenciamento da região D1/D2 dos isolados CLV7, CLA2, CLA7, CLA10, CLOA16, CLOA23, CLOA27 e CLOA71 estes puderam ser identificados em nível de espécie (similaridade $\geq 99\%$), enquanto os isolados CLV9, CLV10, CLV14, CLV15, CLA40, CLOA8, CLOA20, CLOA22 e CLOA40 foram identificados no nível de gênero por apresentarem similaridades entre 97 e 99% com espécies conhecidas.

Com base no sequenciamento da região ITS1/ITS2, os isolados CLV11, CLV20, CLV24, CLV26, CLA1, CLA11, CLA30, CLOA7, CLOA18, CLOA19, CLOA70 e CLOA72 foram identificados no nível de espécie (similaridade $\geq 99\%$), enquanto os isolados CLV17 e CLA8 foram identificados no nível de gênero por apresentarem similaridades entre 97% e $< 99\%$ com espécies já descritas, respectivamente.

Tabela 1- Identificação das leveduras com base na análise de seqüências das regiões D1/D2 do 26 rDNA e regiões ITS1 e ITS2 do rDNA

isolados	identificação	% identidade	score	E- Value ^a	Sequencia realcionada	sequência
CLV 7	<i>Trichosporon asahii</i>	99	1107	0.0	603/605	2
CLV 9	<i>Geotrichum</i> sp.	99	1003	0.0	549/552	2
CLV 10	<i>Geotrichum</i> sp.	98	933	0.0	518/524	2
CLV 11	<i>Trichosporon dulcitum</i>	99	1072	0.0	587/590	1
CLV 14	<i>Trichosporon</i> sp.	98	985	0.0	556/567	2
CLV 15	<i>Geotrichum</i> sp.	98	881	0.0	490/496	2
CLV 17	<i>Galactomyces</i> sp.	97	891	0.0	509/522	1
CLV 20	<i>Trichosporon loubieri</i>	99	917	0.0	502/505	1
CLV 24	<i>Trichosporon loubieri</i>	99	933	0.0	507/508	1
CLV 26	<i>Trichosporon montevideense</i>	99	1048	0.0	572/574	1
CLA 1	<i>Trichosporon loubieri</i>	99	929	0.0	505/506	1
CLA 2	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	99	1118	0.0	608/609	2
CLA 7	<i>Trichosporon asahii</i>	99	1072	0.0	590/594	2
CLA 8	<i>Geotrichum</i> sp.	98	913	0.0	510/517	1
CLA 10	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100	996	0.0	539/539	2
CLA 11	<i>Trichosporon montevideense</i>	100	935	0.0	506/506	1
CLA 30	<i>Trichosporon loubieri</i>	99	920	0.0	509/514	1
CLA 40	<i>Geotrichum</i> sp.	99	1000	0.0	550/554	2
CLOA 7	<i>Trichosporon montevideense</i>	99	1038	0.0	565/566	1
CLOA 8	<i>Galactomyces</i> sp.	98	889	0.0	500/508	2
CLOA 10	<i>Issatchenkia orientalis</i>	99	965	0.0	531/535	2
CLOA 16	<i>Trichosporon asahii</i>	99	1029	0.0	567/571	2
CLOA 18	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99	944	0.0	516/518	1
CLOA 19	<i>Trichosporon montevideense</i>	100	1122	0.0	607/607	1
CLOA 20	<i>Geotrichum</i> sp.	100	953	0.0	516/516	2
CLOA 22	<i>Geotrichum</i> sp.	99	976	0.0	537/541	2
CLOA 23	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99	974	0.0	532/534	2
CLOA 27	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100	985	0.0	533/533	2
CLOA 40	<i>Geotrichum</i> sp.	99	1014	0.0	552/553	2
CLOA 70	<i>Trichosporon montevideense</i>	100	929	0.0	503/503	1
CLOA 71	<i>Trichosporon asahii</i>	99	1040	0.0	572/576	2
CLOA 72	<i>Trichosporon montevideense</i>	99	1022	0.0	558/560	1

^a E-valor. Probabilidade de um dos resultados da busca ter acontecido por acaso.

¹ Sequências obtidas com os iniciadores ITS1 e ITS4, incluindo: a seqüência parcial do rRNA 18S; seqüências completas de ITS 1; do rRNA 5.8S, ITS 2, e seqüência parcial do rRNA 28S.

- ² Sequência parcial do gene 26S ribossomal, obtida com os iniciadores NL1 e NL4 (domínio D1/D2).

Dos 32 isolados de leveduras que apresentaram atividade emulsificante 8 são representantes do gênero *Geotrichum*, 6 são representantes do gênero *Galactomyces* e 17 são representantes do gênero *Trichosporon*. As leveduras do gênero *Geotrichum* (Ascomicetos artroconidiais) representam o estado anamorfo de espécies dos gêneros *Dipodascus* Lagerheim e *Galactomyces* Redhead e Malloch (Kurtzman e Robnett, 1998). Os isolados deste gênero são ubíquos, encontrados em diferentes habitats, tais como tecidos vegetais, e tanques de silagem (O'BRIEN *et al.*, 2005), solo, leite, ar, e água (POTTIER, 2007). Também, as linhagens de *Galactomyces geotrichum* (anamorfo de *Geotrichum candidum*) (REDHEAD e MALLOCH, 1977) são amplamente utilizadas na indústria de laticínios como adjuvantes secundários na produção de queijos a partir de leite de vaca e cabra (POTTIER *et al.*, 2007). Estas linhagens também são utilizadas durante processos de maturação, pois estimulam o desenvolvimento da microbiota bacteriana (GUEGUEN, 1984). *G. geotrichum* desempenha um papel importante no catabolismo de triglicérides e caseína, nas propriedades organolépticas, na textura e na aparência de queijos (BOUTROU e GUÉNGUEN, 2005). Além disso, *G. geotrichum* tem sido descrito por apresentar propriedades antifúngicas contra fungos produtores de toxinas, apresentando assim potencial de utilização no controle biológico de contaminantes nos processos de fermentação de malte (BOIVIN e MALANDA, 1997).

Assim, como nas linhagens do gênero *Geotrichum* ou *Galactomyces* apresentadas neste estudo, não existem relatos sobre a produção de surfactantes ou emulsificantes por leveduras do gênero *Trichosporon*. As linhagens de leveduras pertencentes ao gênero *Trichosporon* são amplamente distribuídas no ambiente e têm sido isoladas de diferentes fontes, incluindo materiais vegetais e animais, ar, solo, e sistema de lodo ativado de estações de tratamento de efluentes (MIDDELHOVEN *et al.*, 2001, SANTOS e LINARDI, 2001). As leveduras do gênero *Trichosporon* apresentam uma ampla variedade de vias metabólicas e por isso são capazes de utilizar uma grande gama de substratos para o crescimento celular, incluindo, parafinas, n-alcanos, fenol e benzeno (BARUA *et al.*, 1970; SINGH *et al.*, 1970; SAMPAIO, 1999; SANTOS e LINARDI, 2001; MIDDELHOVEN *et al.*, 2004). Devido ao potencial metabólico das espécies do gênero *Trichosporon*, a aplicação dessas leveduras para fins ambientais tem se tornado muito promissor (KASZYCKI *et al.*, 2006).

5.3 Determinação da tensão superficial do meio após o crescimento de *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLOA70 e *T. montevidense* CLOA72.

Os isolados *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLOA70 e *T. montevidense* CLOA72 que apresentaram os maiores valores de atividade emulsificante e estabilidade da emulsão durante os ensaios de seleção foram avaliados quanto à capacidade de secretar para o meio de crescimento substâncias capazes de reduzir a tensão superficial do meio.

O isolado *T. montevidense* CLOA72 apresentou o maior valor de redução da tensão superficial do meio de cultura (49,39%), sendo observado um valor de tensão superficial em torno de 34,5 mN/m após 144 h de cultivo. Para os isolados *T. loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40 e *T. montevidense* CLOA70, os valores de tensão superficial do meio crescimento corresponderam a 36,2 mN/m, 40,85 mN/m e 52 mN/m, respectivamente. Estes valores representam uma redução da tensão superficial de 48,17%, 40,3% e 25,55%, respectivamente, quando comparada a tensão superficial inicial do meio de crescimento. A presença de substâncias no meio de crescimento capaz de reduzir a tensão superficial, até um valor de 45 mN/m foi observado para os isolados CLV20, CLOA40 e CLOA72 . Este valor é compatível com a faixa de valores descritos para leveduras do gênero *Candida* e *Yarrowia* (HABA *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2006). Haba *et al.* (2000) estudando a produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Candida* observaram que substâncias tensoativas produzidas por *C. glabrata* e *C. lipolytica* produzem uma redução da tensão superficial do meio de crescimento com valores variando de 35 a 45 mN/m.

Embora, o isolado CLOA 70 produza compostos com boa atividade emulsificante e alta estabilidade desta atividade, esta característica não foi indicativa de uma redução significativa da tensão superficial do meio de cultura livre de células. De acordo com Willumsen e Karlson (1997) a redução da tensão superficial não está necessariamente correlacionada com altos valores de atividade emulsificante.

5.4 Determinação da presença de compostos emulsificantes e surfactantes após extração com acetato de etila e precipitação com etanol

Entre os dois métodos de extração utilizados, a extração com acetato de etila não extraiu compostos com atividade emulsificante e surfactante do meio de cultura livre de células das leveduras *Trichosporon loubieri* CLV20, *T. montevidense* CLOA 70, *Geotrichum* sp. CLOA40 e *T. montevidense* CLOA72 (tabela 2). Entretanto, a presença de compostos tensoativos foi detectada nos extratos obtidos por precipitação com etanol. Os resultados foram expressos em valores de índice de emulsificação para capacidade emulsificante e aumento do diâmetro em mm da gota dispersa em placa de poliestireno para capacidade surfactante. A maior atividade emulsificante (E_{24}) detectada foi observada para o isolado *T. montevidense* CLOA72, cujo valor correspondeu a 78%, e o menor valor foi obtido para o isolado *T. montevidense* CLOA70 ($E_{24} = 64\%$). Os valores de diâmetro das gotas de extratos obtidos dos meios de crescimento dos microorganismos foram de 7 mm. Estes valores representaram um aumento de 2 mm no diâmetro, em relação ao diâmetro de gota do meio mínimo mineral sem crescimento microbiano (tabela 3).

Tabela 2- Atividade emulsificante e surfactante dos compostos recuperados do meio livre de células dos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72.

Isolados	Atividade emulsificante ($E_{24-\%}$)		Atividade surfactante (mm)	
	Ac. de etila	Etanol	Ac. de etila	Etanol
<i>Trichosporon loubieri</i> CLV20	0	68	5	7
<i>Geotrichum</i> sp. CLOA40	0	65	5	7
<i>T. montevidense</i> CLOA70	0	64	5	7
<i>T. montevidense</i> CLOA72	0	78	5	7
Meio mínimo mineral	0	0	5	5

Observação: Nos ensaios, foram utilizados amostras dos compostos extraídos na concentração de 5 mg/mL.

A ausência de compostos surfactantes nos extratos obtidos após a extração com acetato de etila pode ser explicada pela inexistência de biosurfactantes de baixa massa molecular produzidos comumente por leveduras como monoacilgliceróis, manosileritritol-lipídeos (MELs) e soforolipídeos. Estes são preferencialmente obtidos nas extrações com solventes apolares como acetato de etila ou éter metil-terciário-butil (MTBE) (RAU *et al.*, 2005; CAVALERO e COOPER, 2003; KUYUKINA *et al.*, 2001). Bouchez-Naitali *et al.* (1999) observaram que biosurfactantes de alta massa molecular do tipo polimérico não são passíveis de extração com acetato de etila, e nem são separados por processos como cromatografia de camada delgada utilizando solventes com maior caráter apolar como fase móvel. Alguns estudos têm relatado que biosurfactantes de alta massa molecular, como aqueles de alto conteúdo de carboidratos, lipídios e de proteínas podem ser recuperados do meio livre de células por meio da precipitação com acetona, etanol ou metanol-clorofórmio (CIRIGLIANO e CARMAN, 1987; SARUBBO *et al.*, 2006), sugerindo que os compostos produzidos pelas leveduras em estudo tenham composição e massas moleculares similares aos destes estudos.

5.5 Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelos isolados após crescimento em meio mínimo contendo óleo de girassol.

5.5.1. Composição química

Os extratos obtidos por precipitação utilizando etanol e positivos para atividade surfactante e emulsificante foram caracterizados quanto à concentração de carboidratos, proteínas e ácidos graxos (tabela 4). As análises indicaram uma variação na presença de carboidratos totais, de 11,21% a 50%; e de lipídios de 45% a 88,76%, nos biossurfactantes isolados. A presença de proteínas foi detectada somente no biossurfactante produzido pelo isolado CLOA72, cujo percentual foi de 0,92%.

Tabela 3- Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72.

Isolados	Composição (%)		
	Carboidratos	Proteínas	Lipídios
<i>Trichosporon loubieri</i> CLV20	21,27	0	78,70
<i>Geotrichum</i> sp. CLOA40	12,51	0	87,48
<i>T. montevidense</i> CLOA70	11,21	0	88,76
<i>T. montevidense</i> CLOA72	50	0,92	45

Alguns trabalhos da literatura demonstram que os biossurfactantes apresentam uma composição variável e que a presença de carboidratos nem sempre estão em maior concentração nas moléculas dos biossurfactantes estudadas. Sarubbo *et al.* (2006) estudando a constituição de um biossurfactante de alta massa molecular produzido por *C. glabrata* UCP 1002 determinaram a presença de 45% de proteínas, 20% de lipídios e 10% de carboidratos.

Também Vance-Harrop *et al.* (2003), estudando um bioemulsificante produzido por *C. lipolytica* observaram uma variação na composição da molécula com o meio de cultura utilizado durante o crescimento. De acordo com os autores, o biossurfactante poderia apresentar uma constituição de proteínas (54,3% e 43,0%), carboidratos (35,5% e 40,0%) e lipídios (8,4% e 16,0%) quando o microrganismo era cultivado em meio mínimo (YSW) adicionado de glicose ou óleo de babaçu, respectivamente.

5.6 Purificação e caracterização dos biossurfactantes por cromatografia de gel filtração

A purificação dos biossurfactantes mediante a cromatografia de gel filtração foi utilizada para obtenção de frações com ausência de impurezas que pudessem interferir na posterior análise de monossacarídeos e ácidos graxos constituintes dos biossurfactantes. Os perfis cromatográficos das amostras dos biossurfactantes estão representados nas figuras 1(A, B e C) e 2 (A e B).

O fracionamento dos biossurfactantes permitiu a obtenção de apenas 1 pico, com frações positivas para carboidratos totais e atividade emulsificante, para os isolados CLV20, CLOA40 e CLOA70. Por sua vez, no fracionamento do biossurfactante produzido por CLOA72 foram obtidos 2 picos, o primeiro com frações positivas para proteína (eluída de 26 a 32 min) e negativas para atividade emulsificante, e o segundo (36 a 58 min) positivo para carboidratos totais e atividade emulsificante.

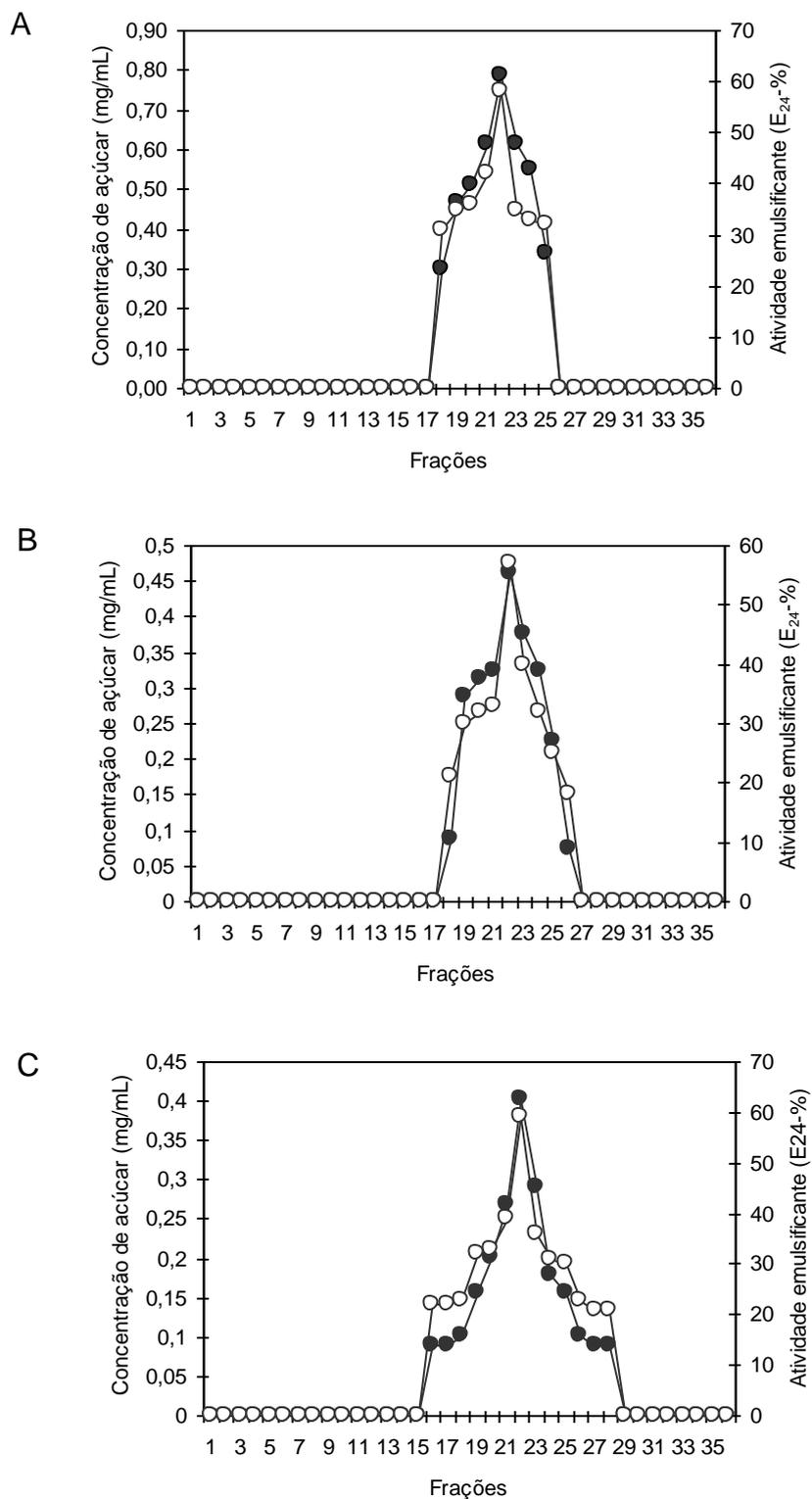


Figura 1 (A, B e C). Perfil de eluição do biosurfactantes dos isolados CLV 20, CLOA40 e CLOA70 em cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200). As frações coletadas foram monitoradas pela medida da absorbância a 280 nm, açúcares totais (método fenol-sulfúrico) (-●-) e atividade emulsificante (E₂₄) (-○-).

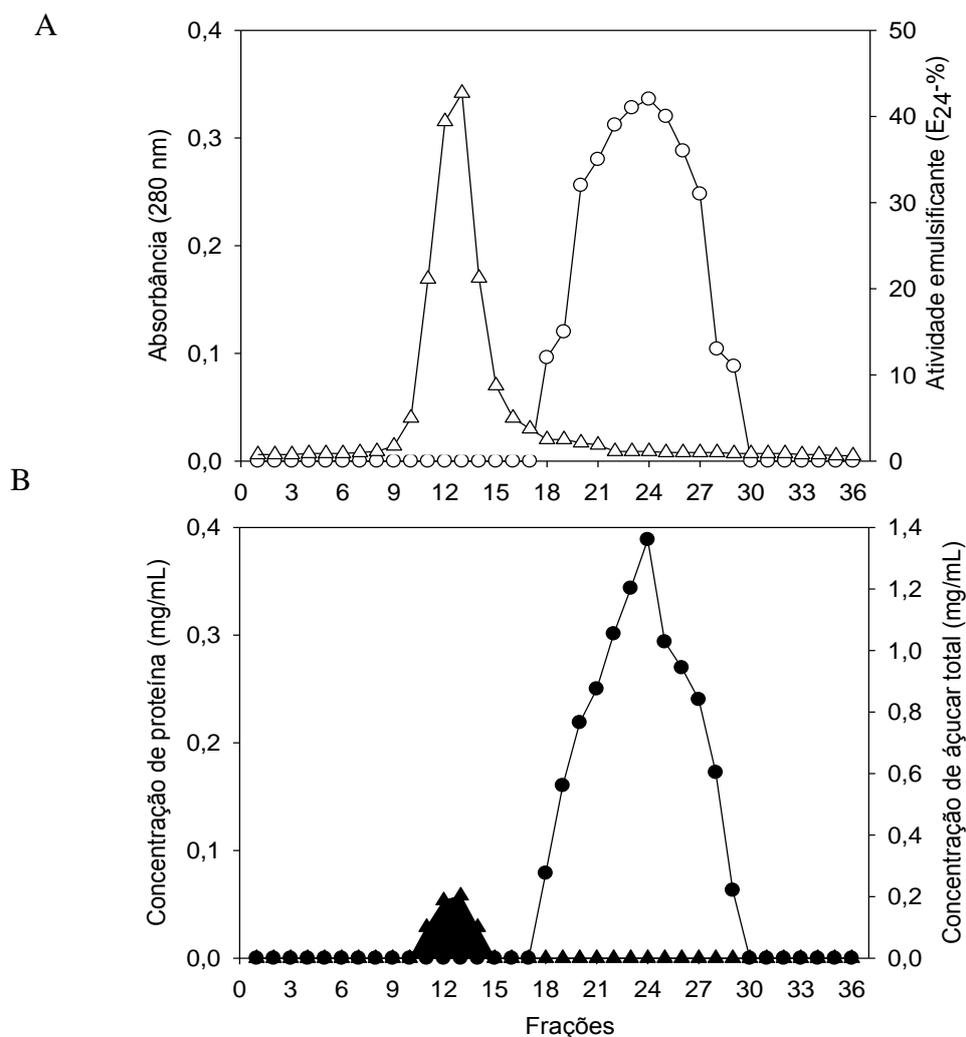


Figura 2 (A e B). Perfil de eluição do biossurfactante obtido do isolado CLOA72 em cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200). As frações foram monitoradas por medida de absorbância à 280 nm (-Δ-), atividade emulsificante (E₂₄) (-○-), açúcares totais (método fenol-sulfúrico) (-●-), e concentração de proteínas (método de Bradford) (-▲-).

O rendimento da purificação dos biossurfactantes, com base na massa recuperada no fracionamento, foi de 99%, 98,5%, 98% e 98% para os biossurfactantes produzidos pelos isolados CLOA20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72, respectivamente.

Considerando que a determinação de proteínas pelo método de Bradford e por absorbância a 280 nm apresentam um limite de detecção de 10 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente, as amostras purificadas foram avaliadas por SDS-PAGE, seguida de coloração dos géis com prata, considerando que esta técnica é mais sensível (faixa de ng). Também, após a coloração com solução de prata nenhuma banda característica de proteína foi observada para os biossurfactantes estudados. Indicando que estas possivelmente estão ausentes nas estruturas moleculares destes surfactantes.

5.7 Caracterização dos ácidos graxos por cromatografia gasosa

As análises de ésteres de ácidos graxos da porção lipídica dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras *Trichosporon loubieri* CLV20, *Geotrichum* sp. CLOA40, *T. montevidense* CLOA70 e *T. montevidense* CLOA72 indicaram a presença de 23 tipos de ácidos graxos com diferentes tipos de saturações, e com cadeias contendo de 8 a 24 carbonos (tabela 5). As análises indicaram uma maior concentração de ácidos graxos contendo 18 carbonos (C₁₈) como: octadecanóico, 10-octadecenóico, *trans*-9-octadecanóico, *cis*-9-octadecanóico, *cis*-6-octadecanóico, *cis*-9, *cis*-12- octadecadienóico, *cis*-9, *trans*-11-octadecadienóico e 9-octadecenóico. Estes ácidos graxos constituem 86%, 71,96%, 76,11% e 39,59%, da fração lipídica dos biossurfactantes dos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72, respectivamente.

Tabela 4- Composição de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos pelos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72.

Ésteres de ácidos graxos	Concentração (%)			
	CLV20	CLOA40	CLOA70	CLOA72
octanóico	0	0	0	2,77
decanóico	0,63	0	0	1,01
undecanóico	0	4,35	0	5,42
tetradecanóico	0	0	0	5
tentradecanóico	0	0	0	2,53
heptadecanóico	0	0	0	5,28
hexadecanóico	7,09	0	5,09	14,92
octadecanóico	0,29	19,70	4,13	16,03
10-octadecenóico	0,60	0	22,19	0
<i>trans</i> -9-octadecanóico	0	0	0	9,63
<i>cis</i> -9-octadecanóico	0	0	0	7,75
<i>cis</i> -6-octadecanóico	0	0	0	6,18
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12- octadecadienóico	42,82	25,87	49,79	0
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-octadecadienóico	34,23	0	0	0
9-octadecenóico	8,06	26,39	0	0
2-pentenóico	1,80	0	0	0
docosanóico	1,82	0,31	8,91	0
tridecanóico	1,44	8,12	0	0
11-(2- <i>hidroxylpentil</i>)undecanóico	0	0,98	0	0
<i>cis</i> -15-tetracosenóico	0	0	0	5,67
tetradocosanóico	0	0	3,7	0
methoxydecanóico	0	1,27	1,8	0
<i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienóico	0	0	0	5,46
Áreas de picos não identificadas	1,22	13,01	4,39	12,35

O conteúdo de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras deste estudo se assemelha ao conteúdo de ácidos graxos de biossurfactantes de alto peso molecular produzidos por bactérias e leveduras, onde é observado que o maior percentual de ácidos graxos é de cadeias com 12, 16 e 18 carbonos. Amaral *et al.* (2006), estudando o biossurfactante Yansan, observaram que o conteúdo de ácidos graxos corresponde principalmente a ácidos de 16 e 18 carbonos, como o ácido hexadecanóico (C_{16:0}) (35, 8%) e ácido octadecanóico (C_{18:0}) (21,4%). Em adição, o conteúdo de ácidos graxos de Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG -1 foi bastante estudado. Diferentes estruturas do biossurfactante, com um número variável de carbonos em suas cadeias podem ser obtidas dependendo do tipo e das combinações de ácidos graxos hidroxilados e não hidroxilados utilizados para o crescimento do microrganismo (ZHANG *et al.*, 1999).

De acordo com Gutnick e Shabtal (1987), a presença de múltiplos substituintes hidrofóbicos (ácidos graxos de 10 a 18 carbonos) na molécula de Emulsan tem sido relacionada a sua alta atividade emulsificante e ao seu poder de estabilizar emulsões. Esses substituintes funcionariam como sítios múltiplos de ancoragem entre a fase contínua e as gotas dispersas formando uma eficiente barreira contra a coalescência da emulsão. Por sua vez, Kaplan *et al.* (1987) relataram que a capacidade emulsificante do biossurfactante produzido pela bactéria *A. calcoaceticus* BD4, semelhante a Emulsan, está ligada a presença de proteínas em sua estrutura. No caso do Emulsan produzido por RAG-1, a proteína não é necessária para a atividade emulsificante, a qual é conferida pela presença de ácidos graxos hidrofóbicos ligados covalentemente a molécula de monossacarídeo (ZOSIM *et al.*, 1982).

5.8 Caracterização dos monossacarídeos por cromatografia gasosa

A composição dos monossacarídeos na estrutura dos biossurfactantes foi determinada por meio da análise de alditóis acetatos por GC-MS. As análises mostraram a presença de seis diferentes açúcares, em diferentes percentagens, nas estruturas dos biossurfactantes. O tipo e a concentração de monossacarídeos variaram conforme o isolado (tabela 6). A xilose foi o açúcar encontrado em maiores percentuais nas estruturas dos biossurfactantes das leveduras CLV20,

CLOA70 e CLOA72, atingindo valores em torno de 54,23%, 59,69% e 41,99%, respectivamente. Também foi observado que as estruturas de todos os biossurfactantes apresentaram o açúcar manose em sua constituição, cujas concentrações variaram de 3,82% a 41,43%.

Tabela 5. Composição de monossacarídeos dos biossurfactantes das leveduras *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLOA 70 e *T. montevidense* CLOA72

Monossacarídeos	Concentração (%)			
	CLV20	CLOA40	CLOA70	CLO72
xilose	54,23	-	59,69	41,99
ribose	2,31	-	9,04	-
manose	4,47	41,43	3,82	35,29
glicose	21,04	7,83	-	5,25
arabinose	11,30	-	27,45	17,47
galactose	6,66	44,33	-	-
Áreas de picos não identificados	-	6,41	-	-

A composição de monossacarídeos dos biossurfactantes das leveduras *T. loubieri* CLV20, *Geotrichum* sp. CLOA40, *T. montevidense* CLOA 70 e *T. montevidense* CLOA72 é similar à descrita para os biossurfactantes produzidos por *Y. lipolytica* IMUFRJ50682, que apresenta arabinose, galactose, glicose e manose nas concentrações de 1,84%, 10,94%, 30,90% e 56,36%, respectivamente (AMARAL *et al.*, 2006), e por *Y. lipolytica* NCIM 3589, que apresenta principalmente manose e galactose (ZINZARDE *et al.*, 1997). Uma composição similar de açúcares também foi observada para um glicolípido produzido pela bactéria *Halomonas* sp. após crescimento em meio contendo hexadecano (PEPI *et al.*, 2005).

Biossurfactantes contendo grupos hidrofílicos com um único tipo de monossacarídeo têm sido descritos, como o produzido por *Curvularia lunata*, que apresenta somente glicose em sua constituição (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002). Micro-organismos produzem substâncias tensoativas classificadas em dois grupos: (i) moléculas anfipáticas de baixa massa molecular contendo lipídios

como: glicolípídeos, ácidos graxos, fosfolipídios e lipopeptídios e (ii) moléculas anfipáticas de alta massa molecular. Os biossurfactantes de alta massa molecular não são efetivos em diminuir a tensão superficial e interfacial de líquidos, mas são muito efetivos em estabilizar emulsões de óleo em água (GUTNICK e SHABTAI, 1987). Os biopolímeros usualmente consistem em uma combinação de polissacarídeos (porção hidrofílica) ligados a componentes hidrofóbicos, como ácidos graxos ou proteínas. Na maioria dos biossurfactantes, esta porção hidrofóbica é necessária para a emulsificação, como nos emulsificantes produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 e *A. calcoaceticus* RAG-1 (KAPLAN *et al.*, 1987; ZOSIM *et al.*, 1982). Neste estudo, os compostos anfipáticos produzidos pelas leveduras *T. loubieri* CLV20, *Geotrichum* sp. CLOA40, *T. montevidense* CLOA 70 e *T. montevidense* CLOA72 apresentaram tanto a capacidade de reduzir a tensão superficial da água como a de estabilizar emulsões tendo tolueno como fase orgânica.

5.9 Cinética de crescimento das leveduras selecionadas e produção dos biossurfactantes

Os dados de crescimento, atividade emulsificante (E_{24}), produção de biossurfactante (g/L) e taxa de produção volumétrica (g/L/h) das leveduras *T. loubieri* CLV 20, *Geotricum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLOA 70 e *T. montevidense* CLOA 72 em meio mineral líquido adicionado de óleo de girassol (20 g/L) são mostrados nas figuras 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Em todos os isolados, a produção dos biossurfactantes foi detectada durante a fase exponencial de crescimento. Entretanto, a produção continua mesmo após a diminuição do crescimento verificada na fase estacionária de crescimento. Cerca de 55,71%, 59,63%, 59,7% e 38,59% dos biossurfactantes são produzidos na fase exponencial de crescimento dos micro-organismos, ou seja, nas primeiras 72 h para as linhagens CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72, respectivamente. Este padrão de produção de biossurfactantes sugere que nestes micro-organismos, a produção é parcialmente associada ao crescimento.

A concentração do biossurfactante (g/L) foi determinada após precipitação do meio de cultura livre de células com adição de etanol. A maior produção de biossurfactante foi observada para o isolado CLOA72 (9,51 g/L). Para este

isolado, a taxa de produção volumétrica máxima correspondeu a 0,377 g/L/h. Para os isolados CLV20, CLOA40, e CLOA70, os valores das taxas de produção volumétrica (g/L/h) foram menores, correspondendo a 0,125, 0,140 e 0,121 g/L/h, respectivamente.

A atividade emulsificante foi linearmente correlacionada com o crescimento de todos os isolados CLV20 ($r=0,868$), CLOA40 ($r=0,958$), CLOA70 ($r=0,923$) e CLOA72 ($r=0,873$), com a produção de biossurfactantes CLV20 ($r=0,902$), CLOA40 ($r=0,889$), CLOA70 ($r=0,885$) e CLOA72 ($r=0,858$), ($r=0,902$, $P<0,05$), considerando o coeficiente de correlação Pearson, com $P<0,001$. A atividade emulsificante máxima foi observada após 120 h de cultivo dos isolados CLV 20, CLOA 40 e CLOA 70, sendo observados valores de E_{24} muito similares (76,1-76%); este período coincidiu com a produção máxima de biossurfactantes. O isolado CLOA72 apresentou o maior valor de atividade emulsificante (78,92%) após 144 h de cultivo. Cinética de produção de biossurfactantes parcialmente ou totalmente associada ao crescimento tem sido reportada para *Curvularia lunata* (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002), *Rhodococcus erythropolis* IM2901 (PHILP *et al.*, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* LBI (BENINCASA *et al.*, 2002) e *Bacillus subtilis* LB5a (NITSCHKE e PASTORE, 2006). Neste estudo, foi observado uma correlação linear entre a concentração celular das leveduras CLV20 ($r=0,628$), CLOA40 ($r=0,774$), CLOA70 ($r=0,676$) e CLOA72 ($r=0,605$), com a produção de biossurfactantes na fase logarítmica, utilizando o coeficiente de correlação Pearson ($P<0,05$). Este comportamento pode ser explicado pelo fato do biossurfactante produzido durante o crescimento das leveduras melhorarem a assimilação da fonte de carbono presente no meio. Os biossurfactantes podem facilitar a utilização de óleos pelos micro-organismos por dois mecanismos, quais sejam: aumento da hidrofobicidade da superfície celular ou aumento da solubilização e dispersão aquosa dos óleos (AL-TAHHAN *et al.*, 2000; ZHANG e MILLER, 1992).

Durante o crescimento dos isolados CLV 20, CLOA 40 e CLOA 70 e CLOA 72 em meio contendo óleo de girassol, não houve alteração na hidrofobicidade das células (dados não mostrados). Este fato sugere que a captação de óleo de girassol envolva a emulsificação e solubilização deste substrato na presença dos biossurfactantes.

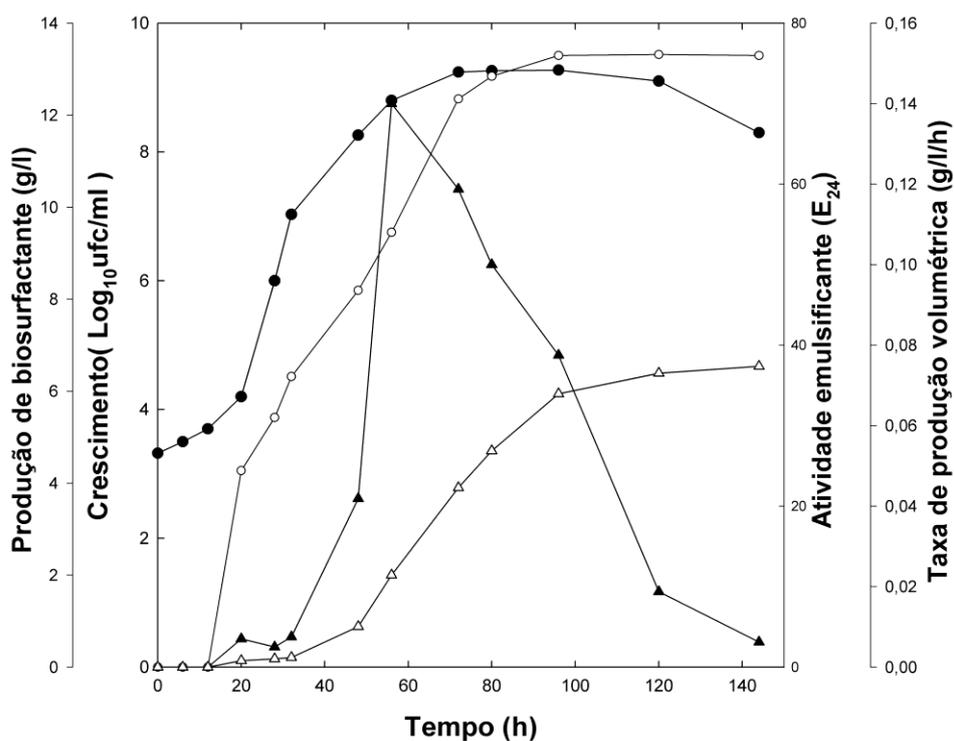


Figura 3. Crescimento e produção de biossurfactante por *Trichosporon loubieri* CLV20 em meio mínimo mineral adicionado de 20 g/L de óleo de girassol, agitação de 180 rpm a 28 °C.

Log ufc/mL (-●-), produção de biossurfactante (g/L) (-△-) atividade emulsificante (E₂₄) (-○-), e taxa de produção volumétrica (g/L/h) (-▲-).

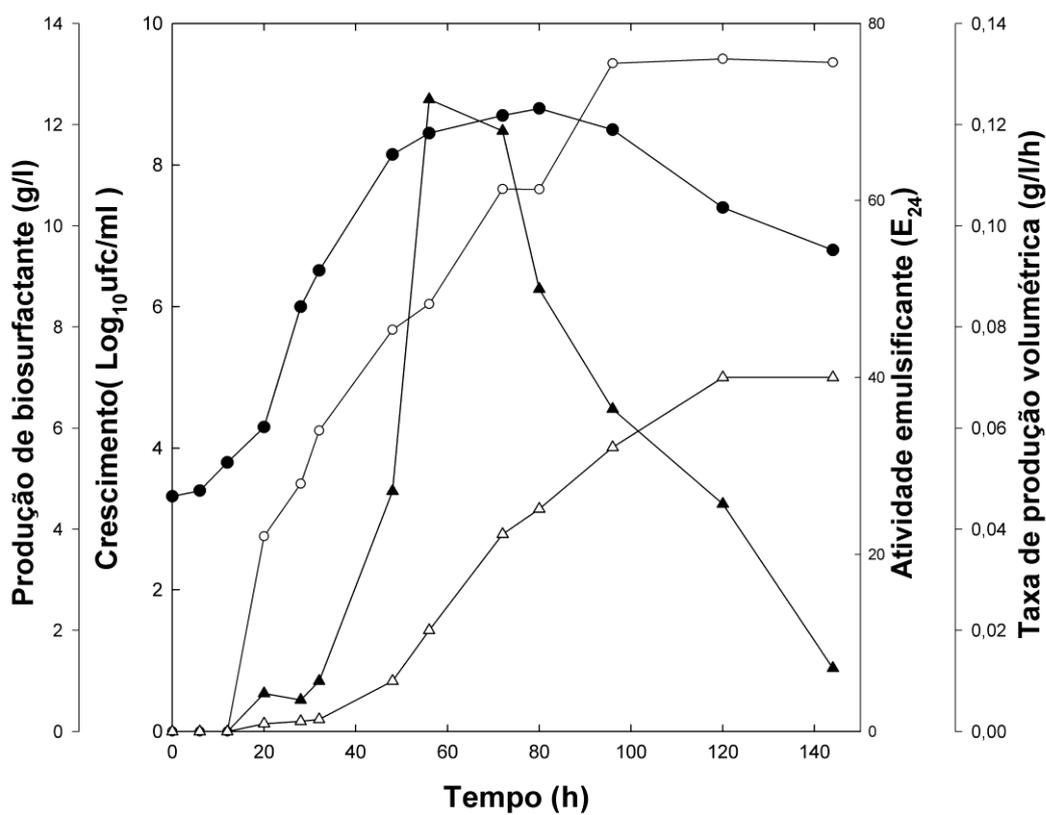


Figura 4. Crescimento e produção de biosurfactante por *Getrichum* sp. 40 em meio mínimo mineral adicionado de 20 g/L de óleo de girassol, agitação de 180 rpm a 28 °C.

Log ufc/mL (-●-), produção de biosurfactante (g/L) (-○-), atividade emulsificante (E₂₄) (-○-), e taxa de produção volumétrica (g/L/h) (-▲-).

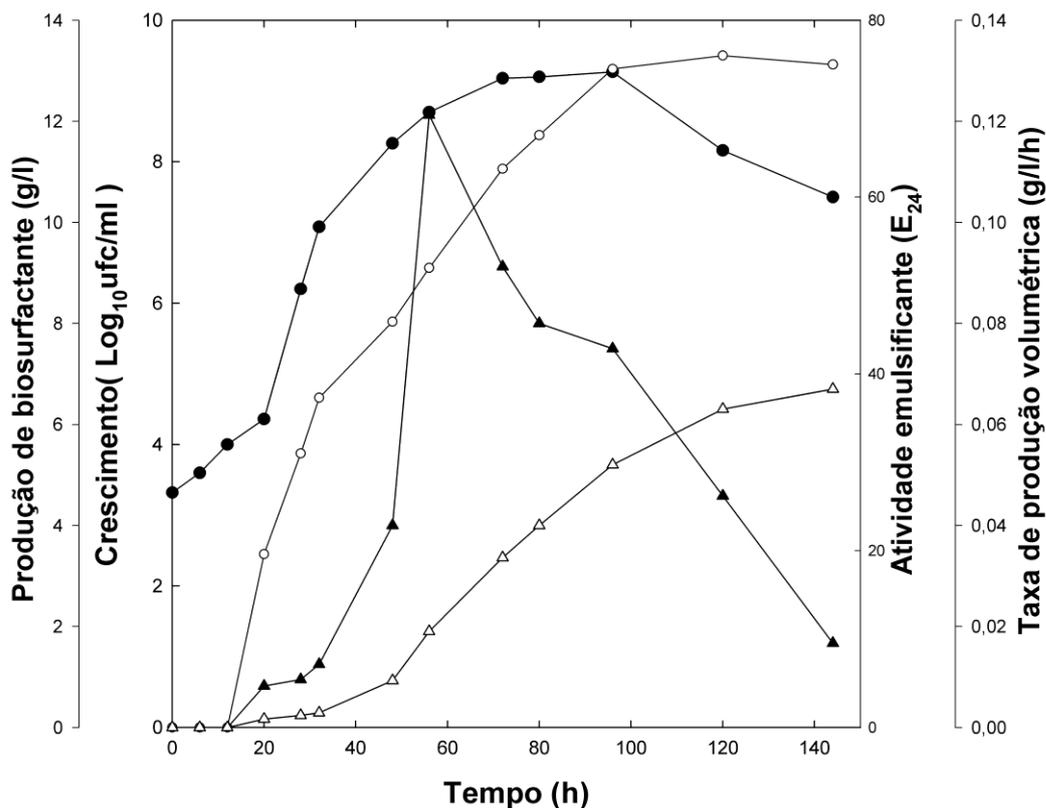


Figura 5. Crescimento e produção de biossurfactante por *Trichosporon montevidense* CLOA70 em meio mínimo mineral adicionado de 20 g/L de óleo de girassol, agitação de 180 rpm a 28 °C.

Log ufc/mL (-●-), produção de biossurfactante (g/L) (-Δ-) atividade emulsificante (E₂₄) (-○-), e taxa de produção volumétrica (g/L/h) (-▲-).

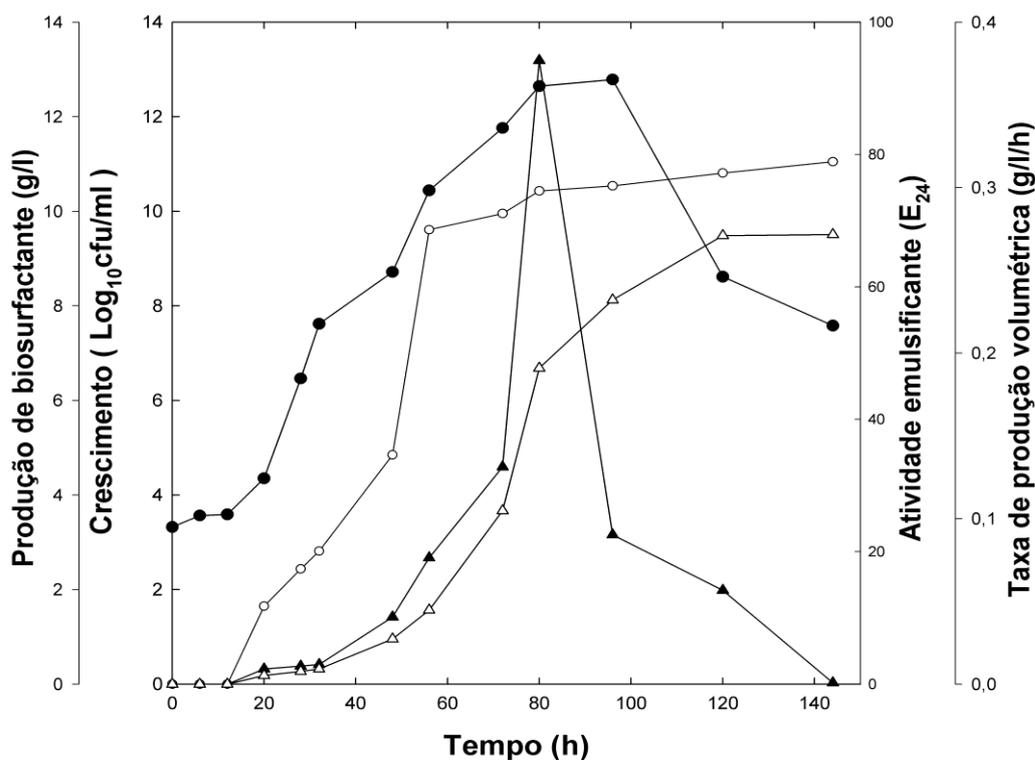


Figura 6. Crescimento e produção de biossurfactante por *Trichosporon montevidense* CLOA 72 em meio mínimo mineral adicionado de 20 g/L de óleo de girassol, agitação de 180 rpm a 28 °C.

Log ufc/mL (-●-), produção de biossurfactante (g/L) (-Δ-) atividade emulsificante (E₂₄) (-○-), e taxa de produção volumétrica (g/L/h) (-▲-).

Os resultados indicam que a produção dos biossurfactantes pelos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72 é parcialmente associada ao crescimento, o que foi indicado pela não coincidência da produção máxima de biossurfactantes e máxima produção de biomassa microbiana. Os valores de rendimento dos biossurfactantes produzidos estão dentro da faixa de valores de produção descritos para leveduras e bactérias a partir de óleos vegetais. Como por exemplo, Sarubbo *et al.* (2006) reportaram um rendimento de biossurfactante em torno de 8 g/L a partir de óleo de canola.

Os maiores valores de atividades emulsificantes (E₂₄) das amostras de culturas livres de células foram observados para os isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA72. Também neste período, foram observados os valores máximos de produção de biossurfactante pelos isolados.

O padrão de produção de biossurfactantes em processos fermentativos é variável e parece estar relacionada à constituição do biossurfactante e ao microrganismo produtor. Alguns padrões têm sido relacionados (1) produção associada ao crescimento, (2) em condições limitantes de crescimento, (3) produção por células microbianas imobilizadas ou “em repouso” (“*resting cells*”) e (4) produção associada a um substrato precursor adicionado em grandes concentrações. Nos casos da produção associada ao crescimento, é observada uma correlação direta entre crescimento, utilização do substrato e a produção do biossurfactante (DESAI e DESAI, 1993).

Zinjarde *et al.* (1997), também estudando a produção de emulsificantes pela levedura *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, observaram que a produção destes compostos é evidenciada só após três dias de crescimento em meio mineral acrescido de hexadecano como fonte de carbono. Também, a maior atividade de emulsificação da cultura livre de células contra tolueno (agente hidrofóbico) foi observada durante o sexto dia, o que correspondeu à fase estacionária de crescimento do microrganismo. Os valores de atividade emulsificante diminuíram após o sétimo dia.

Rau *et al.* (2001) observaram que a produção de soforolipídeos por *C. bombicola* ATCC 22214 em reator é diretamente proporcional ao aumento de massa microbiana por um período de 100 h. Os autores também constataram que a maior taxa de produção do biossurfactante ocorreu após o período de 40 h, já na fase estacionária de crescimento do microrganismo. Em estudo realizado por Cirigliano e Carman (1984), a atividade emulsificante do meio livre de células de *C. lipolytica* foi detectada somente após 30 h da inoculação da levedura, sendo a atividade máxima observada após 130 h de incubação.

5.10 Efeito de várias fontes de carbono no crescimento e na atividade emulsificante de *Trichosporon montevidense* CLOA 72

A densidade celular e a atividade emulsificante de *T. montevidense* CLOA 72 expresso pelo índice de emulsificação (E_{24}) variaram de acordo com a fonte de carbono adicionado ao meio de crescimento (figura 7A e B). Os maiores valores de densidade celular foram observados no meio de crescimento contendo óleo de

girassol, seguido pela glicose, sacarose e glicerol. A atividade emulsificante (E_{24}) foi detectada após 48 h de crescimento da levedura para todos os substratos com exceção do óleo de girassol, que apresentou atividade após 24 h. A fonte de carbono utilizada nos ensaios de cultivo afetou significativamente a atividade emulsificante (Teste Tukey, $p < 0,05$). Os valores de atividade emulsificante (E_{24}) do meio de cultivo livre de células após 96 h contendo óleo de girassol, glicose, sacarose e glicerol foram 75,8%, 32,4%, 29,4%, e 18,1%, respectivamente.

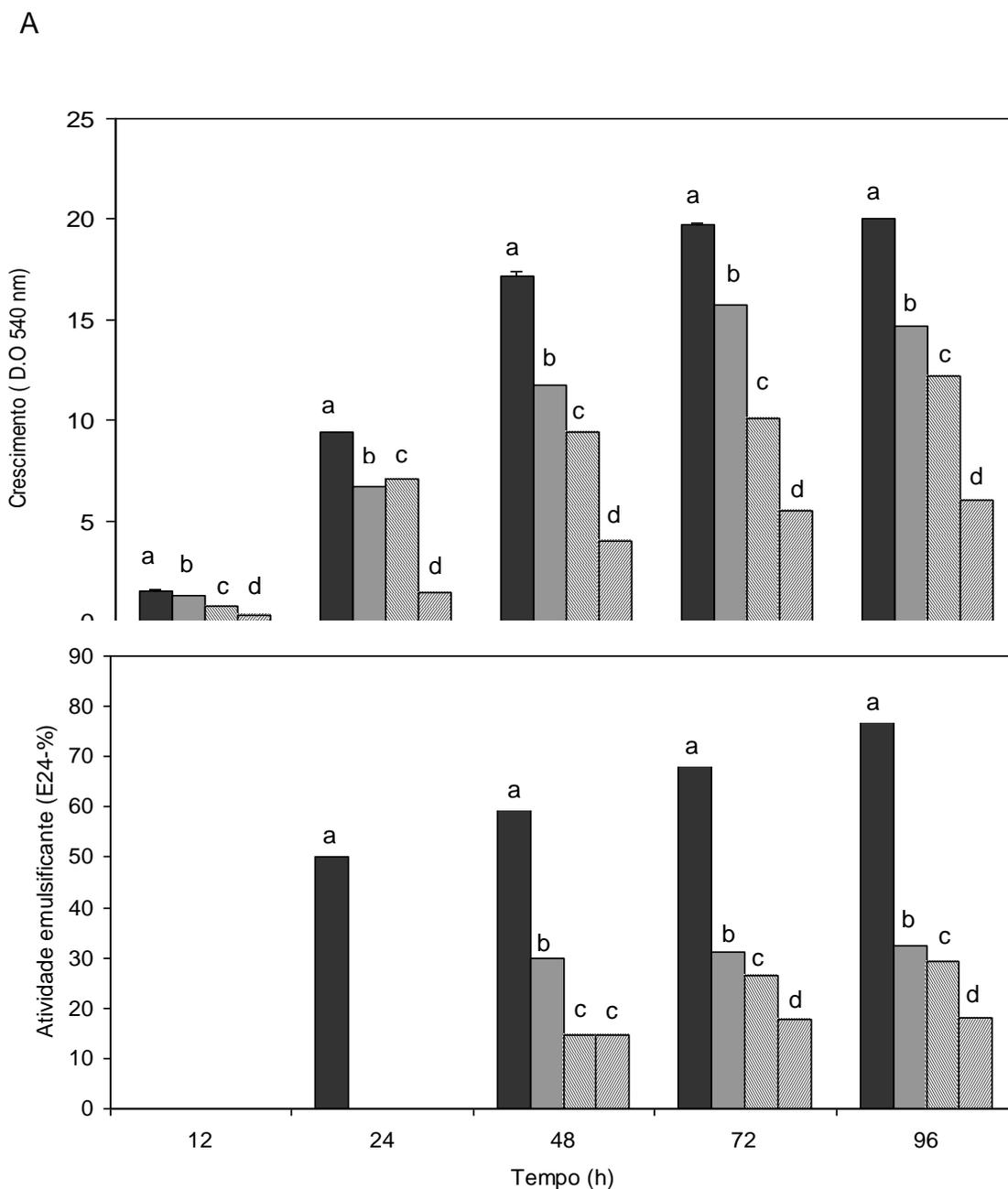


Figura 7- Crescimento (A) e atividade emulsificante (B) de *Trichosporon montevidense* CLOA 72 durante 96 h em meio mineral adicionado de diferentes fontes de carbono (20 g/L): óleo de girassol (█), glicose (■), sacarose (▨), ou glicerol (▩). Os valores de desvio padrão obtidos das médias dos dados de crescimento e E₂₄ foram menores que 13% e 7%, respectivamente. Letras diferentes estão relacionadas com diferenças significativas no crescimento e na atividade emulsificante nas diferentes fontes de carbono.

A levedura *T. montevidense* CLOA72 tem capacidade de produzir compostos com atividade emulsificante a partir de óleo de girassol (fonte hidrofóbica), bem como a partir de açúcares (fontes hidrofílicas), sendo

observadas diferenças significativas entre os valores de atividade emulsificante (E_{24}). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por vários autores que têm demonstrado a dependência do rendimento e da estrutura dos surfactantes microbianos com a fonte de carbono e outros nutrientes disponíveis no meio de crescimento (DESAI e BANAT, 1997; SYLDATK *et al.*, 1985). As fontes de carbono geralmente utilizadas na produção de biossurfactantes podem ser divididas em três categorias: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais. Alguns micro-organismos produzem biossurfactantes utilizando apenas fontes de carbono hidrofóbicas (hidrocarbonetos) ou de óleos vegetais, outros utilizam apenas carboidratos, e alguns outros podem utilizar várias fontes de carbono, quer individualmente ou combinadas (DESAI e BANAT, 1997).

Bonilla *et al.* (2005) observaram que *Pseudomonas putida* ML2 produz atividade emulsificante quando cultivada em um meio mínimo mineral contendo glicose, glicerol, etanol, ou naftaleno como única fonte de carbono, mas para a glicose, a taxa de emulsificação é 10% maior que a observada quando naftaleno é utilizado como uma única fonte de carbono. Por sua vez AMARAL *et al.* (2006) observaram que a capacidade de produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 é dependente de glicose no meio de crescimento, não sendo observada em cultivos com substratos hidrofóbicos. Devido à capacidade de produção de biossurfactante por *T. montevidense* CLOA72 a partir das fontes de carbonos testadas, será possível diminuir os custos de produção destas moléculas utilizando substratos renováveis, como resíduos agroindustriais. Por exemplo, glicerol que é um subproduto da síntese de biodiesel, assim como a sacarose que é obtida de efluentes contendo melaço e em efluentes de indústrias que processam açúcar.

5.11 Determinação do efeito da concentração do biossurfactante na atividade emulsificante

A relação entre a concentração do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 e a atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E_{24}) foi avaliada utilizando tolueno como substrato hidrofóbico (figura 8).

Os valores de índice de emulsificação foram crescentes com o aumento da concentração do biossurfactante presente na fase aquosa até 4,5 mg/mL. Os valores variaram de 7,35% (ensaios contendo 0,38 mg/mL do biossurfactante) para 78,66% (ensaios contendo 4,5 mg/mL). Nenhuma atividade emulsificante foi observada quando foi utilizada a concentração de 0,19 mg/mL do biossurfactante. Isto está de acordo com resultados reportados anteriormente para um composto emulsificante produzido por *Penicillium* sp., que incluem saturação da capacidade emulsificante nos ensaios de emulsificante utilizando concentração acima de 4 mg/mL (LUNA-VELASCO *et al.*, 2007)

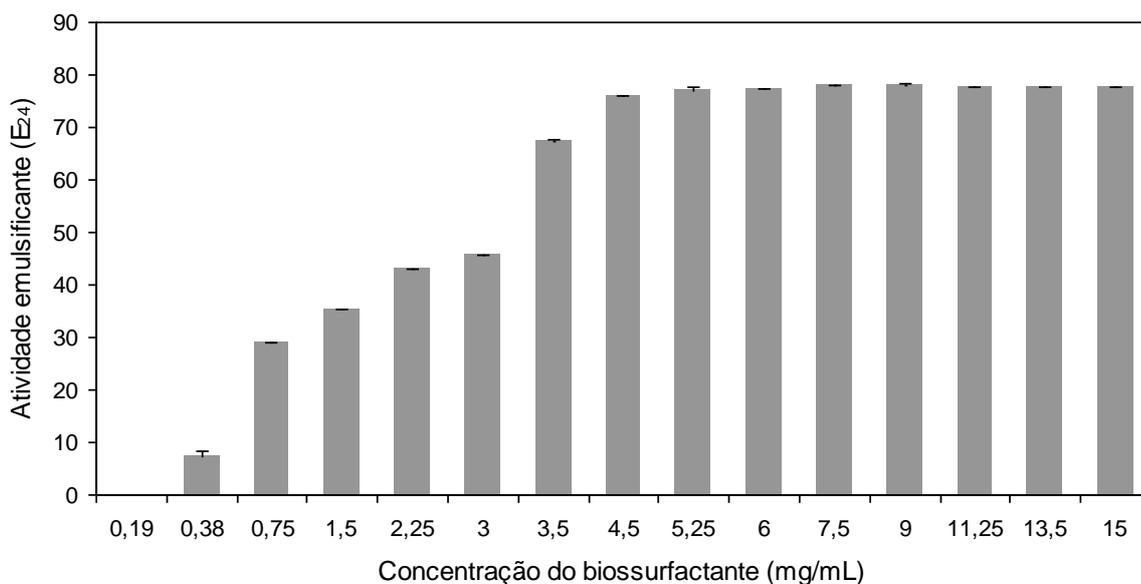


Figura 8 - Efeito da concentração do biossurfactante extraído do meio de crescimento livre de células de *Trichosporon montevidense* CLOA72 na atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E_{24}), usando tolueno como composto hidrofóbico.

5.12 Efeito do pH e da temperatura na atividade emulsificante

A atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 foi avaliada em valores de pH de 1 a 10. A atividade emulsificante não sofreu alteração de seus valores, permanecendo com índices de emulsificação em 77,94 (\pm 0,15) na faixa de pH avaliada (dados não mostrados). Estes resultados são similares aos obtidos para outros microorganismos. A atividade do biossurfactante produzido por *Penicillium* sp. mostrou-se estável em uma grande faixa de pH (3 a 9) (LUNA-VELASCO *et al.*, 2007). Também, a atividade emulsificante apresentada pelo biossurfactante produzido por *C. lipolytica* foi estável em valores de pH entre 2 e 10 (RUFINO *et al.*, 2007).

A exposição do biossurfactante à temperatura de 100 °C por até 60 min não afetou a atividade emulsificante do composto, demonstrando que as propriedades de emulsificação do biossurfactante não foram afetadas pelo tratamento térmico utilizado. Os índices de emulsificação para estes ensaios foram calculados em 78,52% (\pm 0,12). Uma estabilidade da atividade emulsificante após tratamento térmico a 100 °C, também foi observada para o biossurfactante Alasan produzido por *Acinetobacter radioresistens* KA53 (TOREN *et al.*, 2001).

5.13 Efeito de diferentes substratos hidrofóbicos na atividade emulsificante

De acordo com os valores de índice de emulsificação apresentados pelo biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 frente aos diferentes substratos hidrofóbicos, observou-se que este possui uma ampla capacidade de emulsificação (figura 9). A análise estatística dos dados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) mostrou não haver diferença significativa entre os valores obtidos para os hidrocarbonetos tolueno, hexano, isooctano, óleo de algodão, óleo de girassol e querosene, cujos valores permaneceram próximos a 77,94%. Entretanto, diferenças significativas foram observadas entre os valores de atividades emulsificantes obtidas para ciclohexano (75,52%), óleo diesel (73,55%), hexadecano (70,73%), óleo mineral (20,58%) e ácido oléico (9,85%).

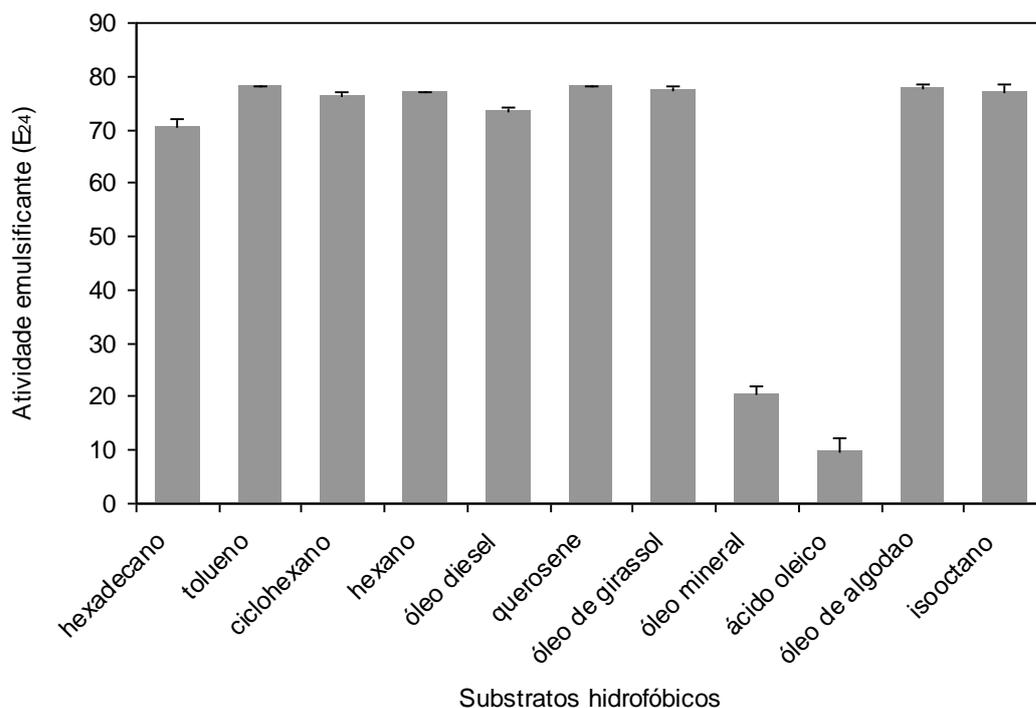


Figura 9 - Atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA72 na concentração de 20 mg/mL na fase aquosa, utilizando diferentes substratos hidrofóbicos. Atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E_{24}).

Vários estudos têm mostrado que biossurfactantes poliméricos de alta massa molecular podem variar na sua capacidade de emulsificar diferentes compostos hidrofóbicos (PHILP *et al.*, 2002; BENINCASA *et al.*, 2002). Foi sugerido que a atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante pelos substratos hidrofóbicos, a qual é mais dependente da interação com os hidrocarbonetos, do que do efeito sobre a tensão superficial do meio (RUFINO *et al.*, 2007). Uma emulsão é formada quando uma fase líquida está dispersa como gotículas microscópicas em outra fase contínua líquida (DESAI e BANAT, 1997). Uma baixa emulsificação de substratos hidrofóbicos pode ser devido à incapacidade do biossurfactante em estabilizar as gotículas microscópicas. A atividade emulsificante de amplo espectro é essencial para os biossurfactantes a serem utilizados em processos industriais, tais como tratamento de efluentes

industriais, a lavagem dos depósitos de contenção substâncias oleosas, bem como o bombeamento de óleos pesados, considerando que eles consistem de misturas de diferentes compostos hidrofóbicos a serem emulsionados.

O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA 72 parece ser um emulsificante muito eficaz e eficiente. Emulsan, um dos mais eficazes emulsificantes, estabiliza emulsões formadas por hidrocarbonetos em concentrações de 0,01 a 0,1 %, mesmo quando utilizado em baixas concentrações (0,02-0,2 mg/mL). No entanto, Emulsan, apresenta grande especificidade pelo substrato - não emulsifica, por exemplo, hidrocarbonetos alifáticos puros, ou hidrocarbonetos aromáticos ou cíclicos. No entanto, todas as fases orgânicas que contêm uma mistura adequada de um hidrocarboneto alifático e um aromático (ou alcano cíclico) são emulsionados eficientemente (ZOSIM *et al.*, 1982). Estudos realizados por Cirigliano e Carman (1984) mostraram que Liposan produzido por *C. lipolytica* apresentou um aumento de atividade emulsificante proporcional ao aumento da cadeia carbônica do hidrocarboneto alifático. Os menores valores de atividade foram observados para hexano e heptano, e a maior atividade para hexadecano. Zinjarde *et al.* (1997) observaram que o biossurfactante produzido por *Y. lipolytica* NCIM 3589, mesmo possuindo uma alta capacidade de emulsificar os compostos hidrofóbicos aromáticos tolueno, xileno, benzeno 1-metil naftaleno, não foi capaz de emulsionar os compostos alifáticos decano, dodecano, tetradecano e hexadecano.

5.14 Efeito da adição de eletrólitos na estabilidade da emulsão

A adição dos eletrólitos bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e cloreto de potássio se mostrou ineficaz para promover a coalescência das emulsões de tolueno formadas com adição de biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 (tabela 7), mesmo quando os eletrólitos foram adicionados em quantidades acima do limite de saturação. Nenhuma alteração visual na altura da camada emulsionada e nem do grau de compactação das gotículas da emulsão foram observadas durante a incubação da emulsão na presença dos eletrólitos utilizados nos ensaios (dados não mostrados). Os índices de emulsificação para

estes tratamentos foram calculados em valores que variaram de 75,94% a 77,89%.

Tabela 6. Efeito da adição de eletrólitos na atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA 72.

Eletrólitos (%) ^a	Atividade emulsificante (E_{24})		
	NaCl	KCl	NaHCO ₃
8	77,52 ± 0,64	77,52 ± 0,64	77,52 ± 0,64
10	77,89 ± 0,65	77,52 ± 0,65	77,52 ± 0,65
12	77,52 ± 0,64	77,14 ± 0,02	77,14 ± 0
14	76,79 ± 1,27	76,06 ± 0,01	76,42 ± 0,63
20	76,79 ± 1,27	75,06 ± 0,0	76,42 ± 0,63
30	76,78 ± 1,3	75,94 ± 0,197	75,95 ± 1,25

a- Eletrólitos diluídos na fase aquosa

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é menos estável na presença das concentrações de sais utilizadas neste estudo (RUFINO *et al.*, 2007; SARUBBO *et al.*, 2006). Dentre os biossurfactantes, já estudados, a alta estabilidade descrita para o biossurfactante produzido por *Penicillium* sp., cuja atividade emulsificante não foi afetada pela adição de NaCl em concentrações na faixa de 5 a 20% (LUNA-VELASCO *et al.*, 2007), e para biossurfactantes sintetizados por *Bacillus subtilis* LB5, que reteve as suas propriedades durante exposição a NaCl, a 20% (NITSCHKE e PASTORE, 2006). Os eletrólitos utilizados no presente estudo são amplamente utilizados no setor industrial, no tratamento de efluentes líquidos emulsionados, para quebra de emulsões, ou recuperação de óleos como biodiesel. Os resultados obtidos para o biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA72 são bastante promissores, considerando que concentrações acima de 2% de sais como NaCl são suficientes para inibir a atividade de surfactantes sintéticos (DESAI e BANAT, 1997). Em adição, o biossurfactante apresenta potencial de utilização na

formulação de emulsões que necessitam da adição de sais de diferentes caracteres iônicos.

5.15 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade emulsificante

As emulsões formadas pelo biossurfactante de *Trichosporon montevidense* CLOA72 tendo como substrato hidrofóbico o óleo de girassol permaneceram estáveis após exposição a temperaturas de 4 °C e 37 °C por 30 dias, os índices de emulsificação (E_{24}) não variaram, permanecendo em torno de 77,94%. As emulsões apresentaram os mesmos aspectos visuais, indicando que essas emulsões podem ser estocadas tanto a 4 °C e 37 °C. Resultados semelhantes foram relatados previamente para biossurfactantes produzidos por *Curvularia lunata* (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002) e *Pseudomonas aeruginosa* MT22 (HABA *et al.*, 2000). A estabilidade de armazenamento é outro fator que interfere na escolha de um emulsificante. As emulsões têm que ser estáveis por longos períodos de estocagem, sendo desejável que as características dos produtos não sejam afetadas por variações na temperatura.

5.16 Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

Os valores da tensão superficial da água após adição do biossurfactante, em diferentes concentrações estão apresentados na figura 10. A Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA72 foi estimada em 2,2 mg/mL, o que correspondeu a uma tensão superficial de 48,4 mN/m. Os níveis de redução da tensão superficial e a CMC de biossurfactantes são dependentes do tipo de biossurfactante e de sua estrutura. Por exemplo, de uma forma geral, os glicolipídeos podem reduzir a tensão superficial da água em até 70% do seu valor inicial, podendo chegar a valores de até 25 mN/m (BOGNOLO, 1997).

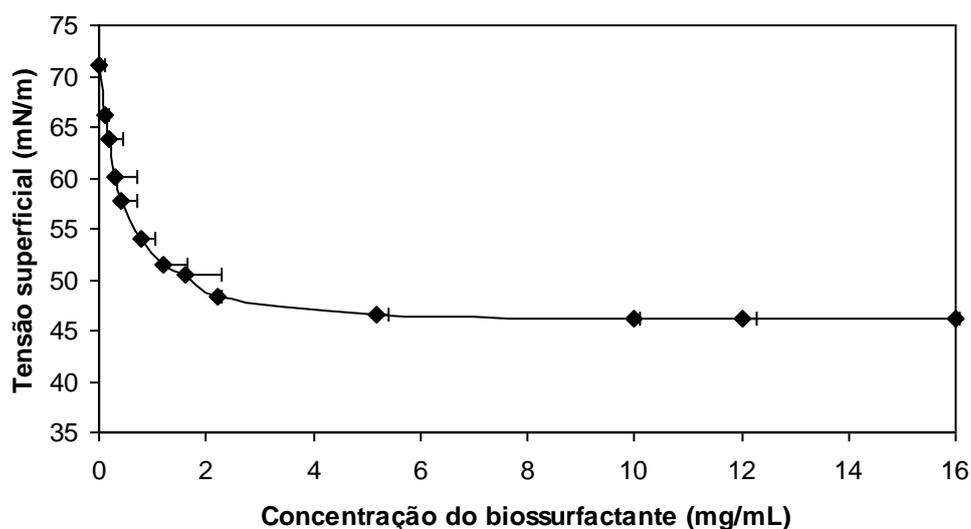


Figura 10. Valores de tensão superficial da água em função de diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA72.

O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 apresentou um valor de CMC menor do que outros biossurfactantes já estudados, como aqueles produzidos por linhagens de *Candida lipolytica*, cujos valores situaram entre 10 mg/mL e 25 mg/mL (RUFINO *et al.*, 2007; SARUBBO *et al.*, 2007), mas superior a do biossurfactante produzido por *Y. lipolytica* (0,5 mg/mL) (AMARAL *et al.*, 2006). Entretanto, o biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 foi um excelente agente emulsificante, característica também requerida em diversos processos industriais. Também, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012) produz um biossurfactante, denominado de Emulsan, de baixa atividade tensoativa, mas de alta atividade emulsificante (GUTNICK, 1987).

5.17 Utilização dos biossurfactantes na redução da formação de biofilmes de *C. albicans* em superfícies de placas de poliestireno

A linhagem de *C. albicans* CC foi selecionada para testes de inibição de formação de biofilmes por biossurfactantes por apresentar uma alta capacidade de formação de biofilmes em estudos anteriores (dados não mostrados). A redução da formação de biofilmes por células de *C. albicans* foi monitorada pela quantificação em espectrofotômetro do corante cristal violeta ligado às células aderidas à superfície dos poços das placas de poliestireno durante a incubação na presença dos biossurfactantes produzidos pelos isolados de *Trichosporon loubieri* CLV 20, *T. montevidense* CLOA70, *Geotrichum* sp. CLOA40 e *T. montevidense* CLOA72, em diferentes concentrações (figura 11). As células de *C. albicans* tratadas com biossurfactante e células não tratadas sobre a superfície de poliestireno foram visualizadas por microscopia ótica, utilizando o microscópio invertido Olympus (figura 12).

Os valores observados sugerem uma redução significativa na formação de biofilmes pelas células de *C. albicans* na superfície dos poços das placas de poliestireno na presença de diferentes concentrações do biossurfactante. Os valores de redução em percentuais observados nos ensaios utilizando 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 mg/mL variaram de 2,15% a 87,41%. Os maiores percentuais de redução na formação de biofilmes foram observados para as células incubadas na presença do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72, seguido do biossurfactante produzido por *T. loubieri* CLV 20. Os percentuais de redução da formação de biofilmes pelos biossurfactantes produzidos por *Geotrichum* sp. CLOA40 e *T. montevidense* CLOA70 não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$).

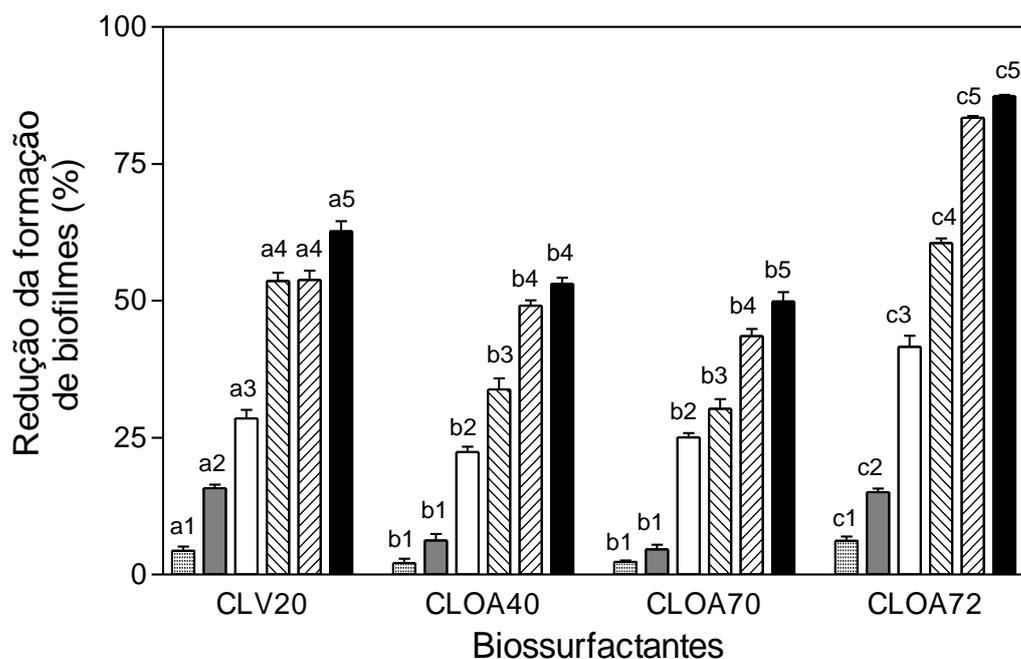


Figura 11- Percentual de redução na formação de biofilmes por *C. albicans* CC na superfície de placas de poliestireno, na presença de diferentes concentrações dos biossurfactantes produzidos pelos isolados CLV20, CLOA40, CLOA70 e CLOA 72, nas concentrações: 0,5 mg/mL (-□-), 1 mg/mL (-■-), 2 mg/mL (-□-), 4 mg/mL (-□-), 8 mg/mL (-■-), e 16 mg/mL(-■-).Ensaio realizado após 24 h de incubação e em três repetições. Médias seguidas pelas mesmas letras ou números não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5 % de probabilidade. Letras e números estão relacionados com o tipo e concentrações do biossurfactante, respectivamente.

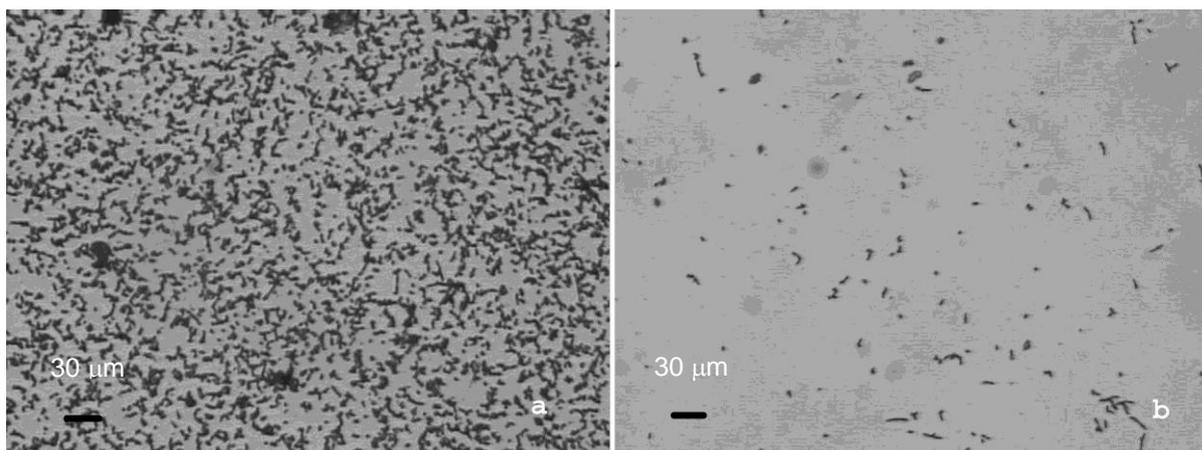


Figura 12- Células de *Candida albicans* CC aderidas à superfície de placa de poliestireno. (a) células aderidas na superfície da placa na ausência do biossurfactante. (b) células aderidas na superfície da placa na presença e 8 mg/mL de biossurfactante.

Até o presente momento, poucos estudos foram feitos visando elucidar o mecanismo de ação dos surfactantes sobre a inibição da adesão e formação de biofilmes por linhagens de *C. albicans*. Mas, alguns destes estudos têm relatado a ocorrência de uma relação direta entre a redução da hidrofobicidade das superfícies de contato (poliestireno) após tratamento com surfactante e a redução na capacidade adesiva das células da levedura (WESENBERG-WARD *et al.*, 2005). Pode ser sugerido que os biossurfactantes produzidos pelos isolados deste estudo se liguem à superfície do plástico formando uma interface hidrofílica, inibindo assim a adesão de células de *C. albicans* CC que é mediada principalmente por interações hidrofóbicas de componentes da superfície celular. Estes componentes são expressos durante a adesão celular, como por exemplo, mannoproteínas contendo resíduos hidrofóbicos.

A atividade anti-adesiva dos biossurfactantes parece estar relacionada às mudanças nas características iniciais hidrofílicas ou hidrofóbicas das superfícies dos materiais expostos a estes compostos. Este mecanismo é denominado de filme condicionado (NEU, 1996). Neste mecanismo, biossurfactantes microbianos podem ser excretados no ambiente externo a célula microbiana e formar um filme sobre a superfície sólida. Na superfície sólida, os biossurfactantes interagiriam com as superfícies pela porção hidrofóbica ou pela porção hidrofílica, dando

origem a uma interface hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente (NEU, 1996). Um exemplo deste mecanismo foi observado para *Serratia marcescens* que excreta um lipopeptídeo capaz de produzir uma interface hidrofóbica sobre superfícies hidrofílicas, provocando o desprendimento do microrganismo destas superfícies (MATSUYAMA *et al.*, 1989).

Os biossurfactantes produzidos por bactérias foram estudados quanto a sua propriedade de inibição de adesão de micro-organismos potencialmente patogênicos em superfícies de poliestireno e de silicone (RODRIGUES *et al.*, 2006; BUSSCHER *et al.*, 1997). Entretanto, foi constatada uma variação na inibição da adesão dos diferentes micro-organismos estudados. Os efeitos na inibição de formação de biofilmes por células de *C. albicans* CC pelos biossurfactantes produzidos pelas leveduras *T. loubieri* CLV 20, *T. montevidense* CLOA70, *Geotrichum* sp. CLOA40 e *T. montevidense* CLOA72 têm valores semelhantes ou até mais expressivos se comparado aos encontrados em estudos recentes sobre o efeito de biossurfactantes produzidos por bactérias láticas na adesão de micro-organismos. O efeito na adesão de *C. albicans* GBJ 13/4A pelo biossurfactante produzido pela bactéria *Streptococcus thermophilus* se mostrou ineficaz em baixas concentrações. Foi observado que na concentração de 40 mg/mL ocorreu uma redução de 15% na adesão de *C. albicans*. Entretanto, o biossurfactante possui uma alta capacidade anti-adesiva contra *Streptococcus salivarius* GB 24/9, *Staphylococcus aureus* GB2/1, *S. epidermidis* GB 9/6 e *Rothia dentocariosa* GBJ52/2B, com valores de inibição de adesão situando entre 36% a 77% (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Os biossurfactantes também podem formar um filme sobre a célula ao se ligarem aos grupamentos hidrofóbicos livres existentes na superfície celular, modificando o seu caráter hidrofóbico. Mecanismo semelhante a este foi observado por outros autores. Pijanowska *et al.* (2007) mostraram que a adição do surfactante saponina na concentração de 80 mg/L em culturas de *Pseudomonas aeruginosa* TK crescidas em hexadecano e dodecano diminuiu a hidrofobicidade celular do microrganismo em 23%. Chrzanowski *et al.* (2005) também observaram que surfactantes não-iônicos reduziram a hidrofobicidade da superfície celular de *Candida maltosa* durante crescimento em meio adicionado de hidrocarbonetos.

Estudos sobre a inibição de adesão de células de linhagens de *C. albicans* e de outros micro-organismos potencialmente patogênicos a superfícies plásticas por biossurfactantes produzidos por leveduras são escassos até o presente momento. Os dados demonstram uma possível utilização dos biossurfactantes obtidos neste estudo na inibição da formação de biofilmes por células de *C. albicans* com alta capacidade adesiva em materiais não biológicos.

5.18 Determinação do efeito do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLO72 na redução do crescimento de *C. albicans*

Considerando que muitos biossurfactantes isolados de micro-organismos foram relatados por exibirem atividade antimicrobiana, o biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 foi avaliado quanto a este efeito.

A adição de biossurfactante nas suspensões celulares de *C. albicans* na concentração de 16 mg/mL, provocou uma redução no crescimento de 7,48 Log₁₀ ufc/mL para de 6,34 Log₁₀ ufc/mL (figura 13). Estes valores foram estatisticamente significativos pelo teste de Tukey, com $P < 0,05$. No entanto, a redução do crescimento não foi estatisticamente significativa quando se utilizou o biossurfactante em concentrações de até 3 mg/mL.

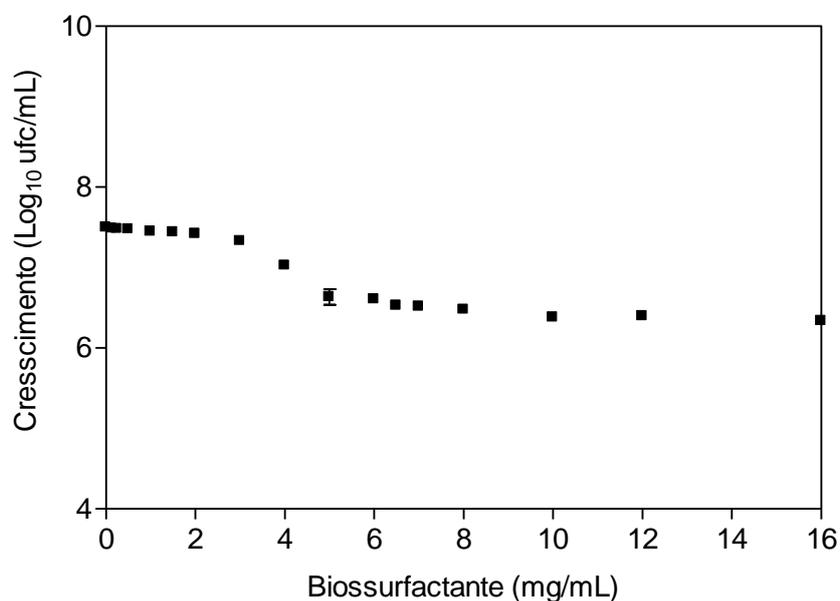


Figura 13- Concentração celular de *Candida albicans* CC (Log₁₀ ufc/mL) em meio adicionado de diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72

O interesse inicial pelos biossurfactantes foi originado pela suas propriedades antimicrobianas. Os dois biossurfactantes mais bem estudados, ramnolípídeo e surfactina, foram primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968, respectivamente, por estas características (MAIER, 2003). Entretanto, a ação antimicrobiana parece ser variável conforme a estrutura do biossurfactante em estudo e o microrganismo submetido aos testes de inibição. Os valores de crescimento do isolado de *C. albicans* CC na presença do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 indica que a inibição da formação de biofilmes se deve principalmente a interação deste com as células. Uma vez, que durante os ensaios de inibição de crescimento pelo biossurfactante foi observada uma redução não significativa da concentração celular. Alguns estudos mostram que os biossurfactantes além de apresentar propriedades detergentes podem ter

forte ação desestabilizante de membranas por interagirem com os fosfolipídios e assim, conferir propriedade antimicrobiana contra fungos e bactérias, mesmo em baixas concentrações (CARILLO *et al.*, 2003).

Em estudos semelhantes sobre o efeito do biossurfactante do tipo glicolípido produzido *Streptococcus thermophilus* A sobre de células *C. albicans*, foi observado uma inibição do crescimento celular somente em concentrações acima de 5 mg/mL (CIM) (RODRIGUES *et al.*, 2006). Biossurfactantes manosileritritol-lípido (MEL-A e MEL-B) obtidos de *Candida antarctica* T-34, também tem sido descritos pela sua ação antimicrobiana contra células de *C. albicans*, sendo que os valores de concentração inibitória mínima foram acima de 0,4 mg/mL.

Em estudos sobre o efeito do biossurfactante ramnolípido produzido pela bactéria *Pseudomonas sp.* S-17 em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi verificado a existência de uma baixa toxicidade do surfactante mesmo em concentrações de 5%. Entretanto, foi observada a ocorrência de um aumento na permeabilização celular de *S. cerevisiae* que foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do biossurfactante (VASILEVA-TONKOVA *et al.*, 2001).

5.19 Determinação da hidrofobicidade celular durante a formação de biofilmes por *C. albicans* na presença de biossurfactante

A hidrofobicidade celular foi quantificada a fim de relacionar a capacidade de adesão do microrganismo com suas características de superfície celular. As células de *C. albicans* apresentaram uma hidrofobicidade celular antes da incubação em meio RPMI de 40,22% ($\pm 3,18$) nas placas (tempo zero) (figura 14). A hidrofobicidade das células incubadas sem adição do biossurfactante aumentou para 55,55% ($\pm 4,89$) após 24 h de incubação. Entretanto, nos ensaios contendo o biossurfactante a hidrofobicidade celular de *C. albicans* sofreu uma variação de 40,22% ($\pm 3,18$) a 46,22% ($\pm 1,68$) após 24 h. Estes valores foram significativamente diferentes dos valores obtidos dos ensaios sem adição do biossurfactante, quando comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

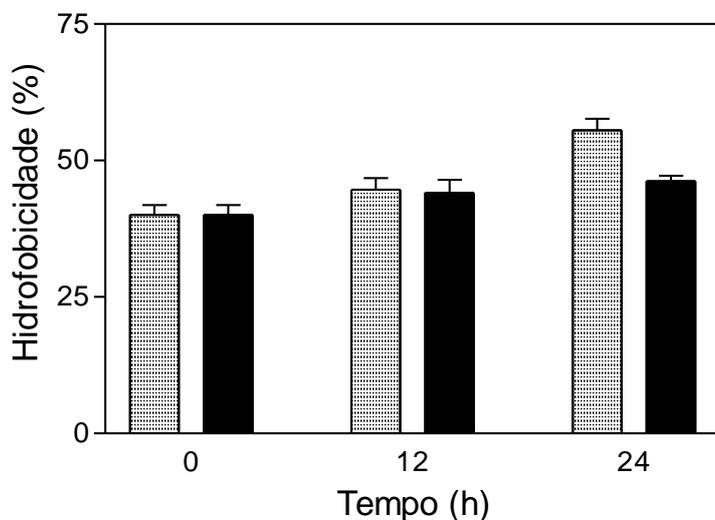


Figura 14. Medida de hidrofobicidade celular durante a formação de biofilmes de *Candida albicans* CC na ausência (▨) e na presença de 4 mg/mL de biossurfactante (■). Ensaio realizado nos tempos de 0, 12 e 24 h de incubação a 37 °C.

Os dados obtidos na determinação da hidrofobicidade celular indicam que o biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 impede o aumento da hidrofobicidade superfície celular em *C. albicans* CC durante a formação de biofilmes nas condições testadas. Entretanto, as células não apresentaram redução dos valores iniciais de hidrofobicidade. Os valores de hidrofobicidade celular das células incubadas na presença de biossurfactante podem estar relacionados com a inibição da formação de tubos germinativos ou hifas durante os processos de adesão na superfície do plástico. Diversos autores mostraram que a formação de tubos germinativos está relacionada ao aumento da hidrofobicidade celular da linhagem de *C. albicans* (TRONCHIN *et al.*, 1888; RODRIGUES *et al.*, 1999). Em contraste, foi mostrado que os blastoconídios de diferentes linhagens de *C. albicans* se mostraram essencialmente hidrofílicos, sendo observado após a incubação das células em condições apropriadas um aumento significativo da hidrofobicidade celular (RODRIGUES *et al.*, 1999).

Altas taxas de formação de pseudomicélio ou hifas verdadeiras estão associadas a altos valores de hidrofobicidade celular de linhagens de *C. albicans* e não-*albicans*. Tem sido proposto que o aumento da hidrofobicidade celular inerente à formação de tubos germinativos pode representar um mecanismo de aderência não somente a superfície de células epiteliais, mas também a superfícies inertes, como por exemplo, tubos plásticos endotraqueais e cateteres (RODRIGUES *et al.*, 1999).

5.20 Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)

Com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de interação entre o biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA 72 e as células de *C. albicans* CC, os parâmetros termodinâmicos deste processo foram determinados por calorimetria isotérmica de titulação. Esta técnica utiliza como sonda a medida direta do fluxo de calor envolvido em uma reação. Considerando que qualquer processo reacional envolve sempre quebra e formação de interações intermoleculares, e que associado a estes fenômenos existe um fluxo de calor, a técnica serve como detector universal de fenômenos químicos e bioquímicos (REKNARSKY *et al.*, 1998; IRWIN *et al.*, 1998).

Na figura 15 está apresentada a curva de titulação do biossurfactante em células de *C. albicans* CC (após a subtração das curvas controle). O procedimento de subtração foi realizado com objetivo de excluir matematicamente os efeitos de interação biossurfactante-biossurfactante e células-células, explicitando apenas as interações biossurfactante-célula.

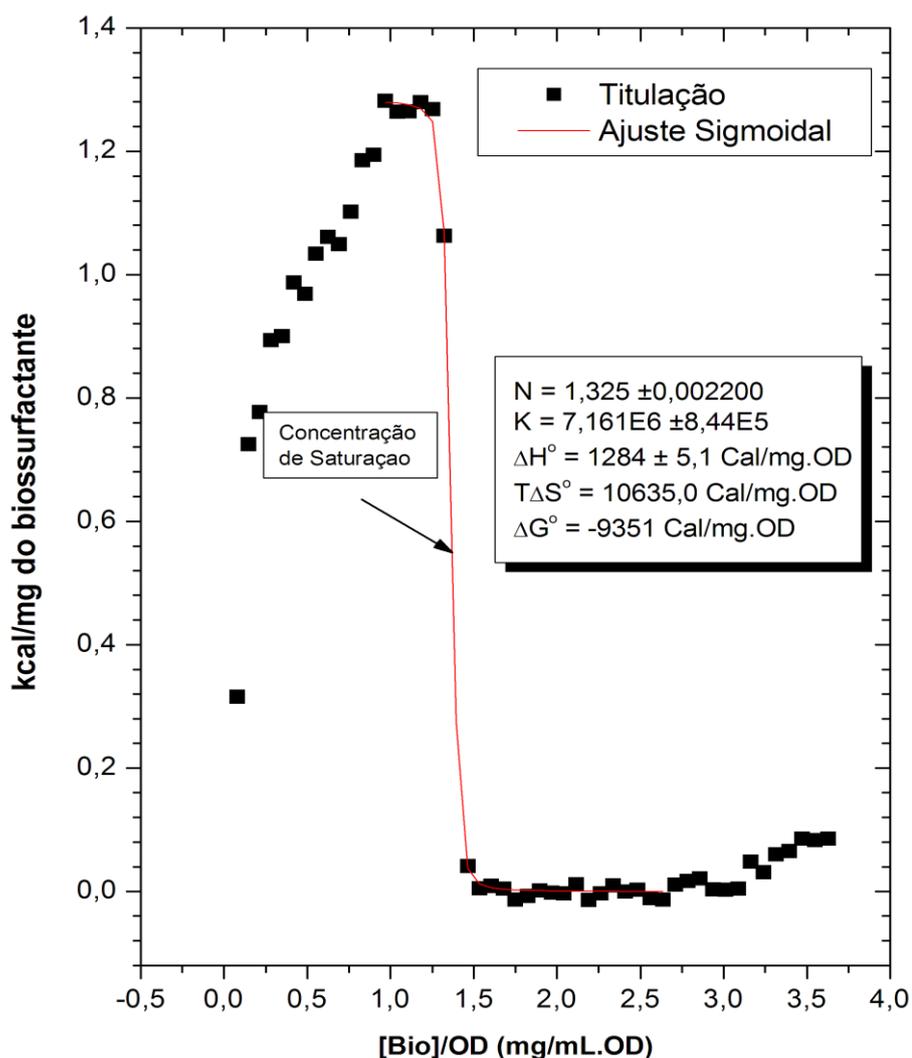


Figura 15. Curva de titulação calorimétrica do biossurfactante (13 mg/mL) em células de *C. albicans* CC na concentração inicial de 1.0 DO₆₀₀.

A curva mostrada na figura 15 possui um perfil sigmóide, com uma inflexão à concentração próxima de 1,3 mg/mL.DO₆₀₀. Tal comportamento sugere uma forte interação entre o biossurfactante com as células, bem como uma possível saturação das células pelas moléculas de biossurfactante (TURBULL *et al.*, 2003; VEGA-RODRIGUES *et al.*, 2003).

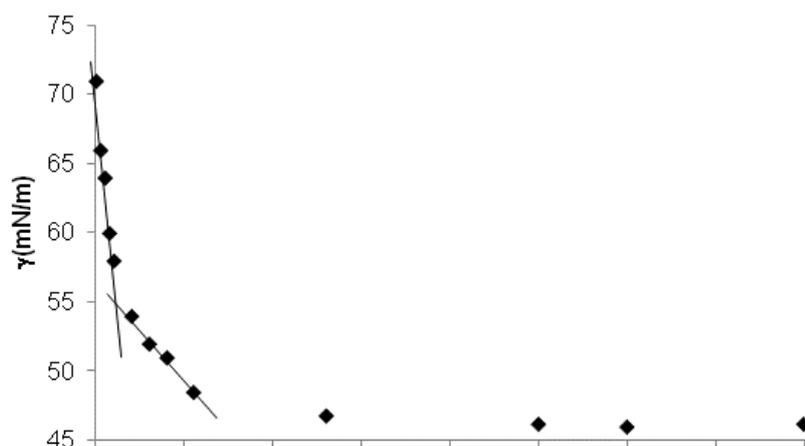
De acordo com os dados termodinâmicos apresentados também na figura 5, o processo é endotérmico ($\Delta H^\circ = +1284 \pm 5,1$ Cal/mg.DO₆₀₀) ocorrendo com um elevado aumento de entropia ($T\Delta S^\circ = +10635,0$ Cal/mg.DO₆₀₀). Os valores

termodinâmicos do ensaio de ITC sugerem o deslocamento de moléculas de água da superfície das células seguida pela substituição pelo biossurfactante. Tal fenômeno é bem explicado na literatura em termos da quebra de ligações de hidrogênio (fenômeno endotérmico) e ganho de liberdade translacional e rotacional pelas moléculas de água (responsável pelo aumento de entropia) (REKNARSKY *et al.* 1995).

O valor de concentração de 1,3 mg/mL.DO₆₀₀ é atribuído a uma concentração mínima para saturação das células. Concentração esta a partir da qual todas as células do sistema estão efetivamente cobertas por biossurfactante, de tal forma que suas propriedades superficiais são totalmente diferentes daquelas que permitem a adesão em superfícies. Após esta concentração, o sistema tende a um equilíbrio térmico, caracterizado pela diluição do excesso de biossurfactante no meio, não existem mais sítios disponíveis nas células para ligação de biossurfactantes e a energia envolvida desenvolvida durante a titulação tende à zero.

A Figura 16 B mostra o calor de interação obtido por titulação de uma solução de 13 mg/mL do BS em água, a 25 °C. A curva exibiu um valor de concentração crítica de interação correspondente a 2,53 mg/mL, dado pelo ponto de inflexão da curva, e entalpia de micelização (ΔH) de 0,453 Kcal/mg, dado pela distância entre as extrapolações das retas abaixo e acima da CMC. Abaixo da CMC (2,53 mg/mL), o calor aumentou linearmente com a concentração e acima da CMC o calor diminuiu. Abaixo da CMC, o calor de interação endotérmico, que se deve à diluição da solução micelar e desmicelização, aumentou linearmente com a concentração de surfactante. Na região da CMC, quando as micelas começaram a se formar, o calor sofreu uma brusca diminuição, pois o calor de desmicelização tendeu a zero, restando apenas o calor de diluição. Após a região da CMC, o calor de diluição diminuiu linearmente, pois um número crescente de micelas se formou. Este padrão de liberação de energia foi alterado nos ensaios de titulação das células com soluções do biossurfactante (figura 15), onde já foi observada uma queda da liberação de energia na concentração de 1,3 mg/mL, considerada como sendo atribuído a concentração mínima para saturação das células.

A



B

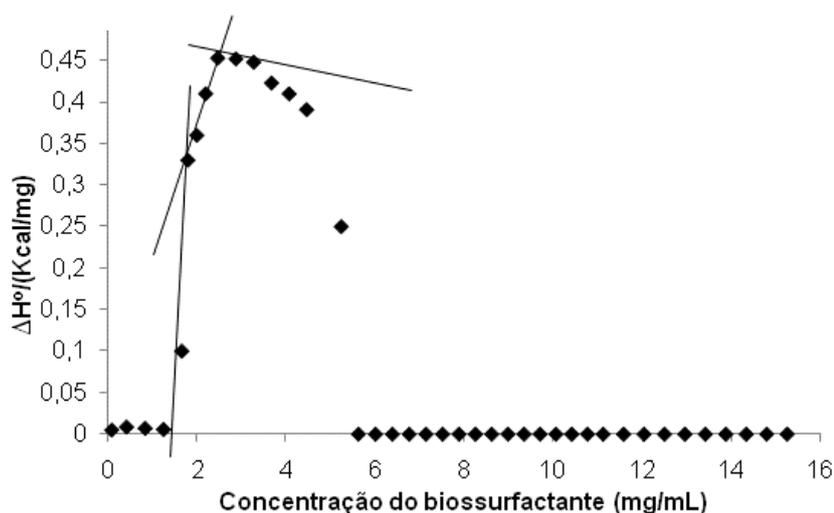


Figura 16 (A e B). Valor de CMC por tensiômetro (A). Calor de interação do biossurfactante com água, obtido por ITC a 25 °C (B). CMC = 2,53 mg/mL e entalpia de micelização $\Delta H = 0,543$ Kcal/mg.

O valor de CMC do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 (figura 10 e 16A) determinado por tensiômetro foi próximo ao valor de CMC obtido por Calorimetria Isotérmica de Titulação (2,53 mg/mL). A curva apresenta 2 inflexões, a primeira próxima de 0,44 mg/mL e a segunda próxima de 2,5 mg/mL. A primeira inflexão poderia indicar a ocorrência de formação de diferentes tipos de agregados, como hemimicelas em função da concentração de biossurfactante. A diminuição da tensão superficial de líquidos, concomitantemente com a micelização do biossurfactante, pode estar relacionada aos efeitos de inibição da adesão de células de *C. albicans* CC evidenciados durante os ensaios de inibição da formação de biofilmes na superfície de poliestireno. Tem sido relatado que tanto moléculas livres de surfactantes (hemimicelas) quanto micelas podem adsorver na superfície celular de micro-

organismos e em superfícies sólidas bloqueando ou facilitando a adesão microbiana em interfaces hidrofóbicas quanto em interfaces hidrofílicas (NEU, 1996).

5.21 Efeito do biossurfactante no potencial zeta (ZP) da superfície celular de *C. albicans*

Quase todos os materiais macroscópicos ou particulados adquirem uma carga elétrica superficial quando estão em contato com um líquido. O potencial zeta é um indicador dessa carga e é importante nos estudos de química de superfície, visto que pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. A medida do potencial zeta tem sido descrita como uma nova ferramenta para estudos de processos de dispersão e agregação de células, bem como estudos das características de superfície celular de microorganismos.

As medidas de potencial zeta (PZ) foram realizadas com o objetivo de corroborar a hipótese levantada a partir dos dados de ITC, sobre o mecanismo superficial de interação do biossurfactante com as células, uma vez que o PZ representa uma medida da energia potencial de uma superfície, normalizada pela sua carga total. Assim, o potencial zeta da superfície celular foi determinado em função da concentração do biossurfactante adicionado a suspensão de células de *C. albicans* CC, de maneira similar ao realizado nos experimentos de ITC varrendo-se a mesma faixa de concentração de titulante e com a mesma concentração de titulado.

Na figura 17B estão apresentados os valores de potencial zeta das células em função da concentração de surfactante. As medições indicaram uma carga inicial negativa da superfície, com valor de potencial situando em torno de -16 mV. Entretanto, com adição do biossurfactante ocorreu um aumento da carga elétrica positiva da superfície celular, com valores que variaram em até -6 mV, provavelmente devido à remoção de íons juntamente com as moléculas de água. É importante ressaltar que a técnica utilizada para as medidas de potencial zeta utiliza como sonda a luz espalhada, sendo esta, sensível à presença de nano ou micropartículas. Portanto, o potencial zeta medido no ensaio é referente à

superfície das células e não do biossurfactante (embora esses possam causar alterações superficiais nas células).

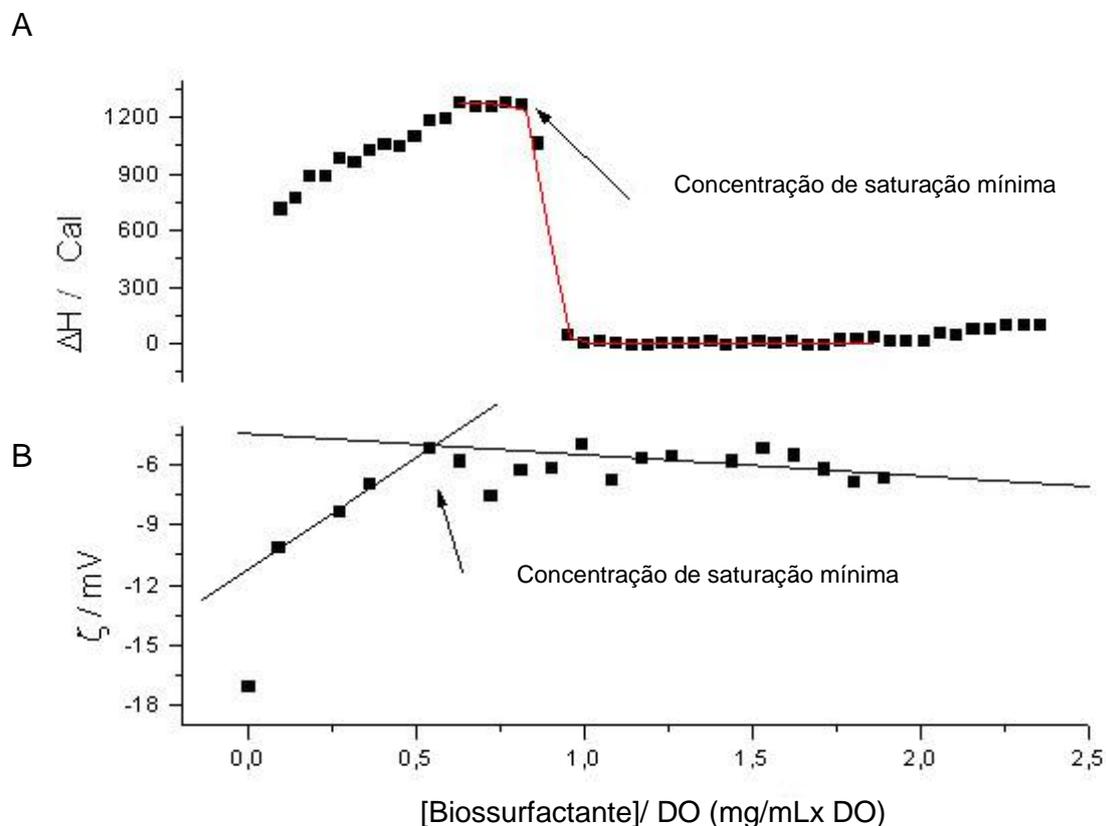


Figura 17A e B. Titulações calorimétricas (ΔH /Kcal) e medida de potencial zeta (ζ /mV) após injeções sucessivas do biossurfactante (■) em solução aquosa contendo células de *C. albicans* CC.

No gráfico do potencial zeta, é interessante notar que existe um valor de concentração (1 mg/mL x DO) a partir do qual os valores de potencial zeta tende a se tornar constante, sugerindo também o recobrimento das células pelas moléculas do biossurfactante. Este valor de concentração, embora seja menor do que aquele observado nos experimentos de ITC (figura 17 A) é da mesma ordem de grandeza. Além disso, nas medidas de potencial zeta, existem erros experimentais maiores, os quais são oriundos de injeções manuais, enquanto que no ITC as injeções são automatizadas.

Em estudos realizados por HENRIQUES *et al* (2007) sobre o potencial zeta de superfícies celulares das leveduras *C. albicans* 12A e *C. albicans* 46B foi verificado cargas líquidas de -14 mV e - 8 mV, respectivamente. Entretanto, não foi possível correlacionar os altos valores de carga negativa das células de *C. albicans* 12A com capacidade de formação de biofilmes por esta levedura, já que a capacidade de formação de biofilmes não variou com relação a células de *C. albicans* 46B que apresenta uma carga superficial mais positiva

Em estudos anteriores tem sido demonstrado que os biossurfactantes UC (produzido a partir do crescimento em meio adicionado de n-undecano) e MEL na concentração de 3% adicionados a suspensões de *C. antarctica* pode alterar a carga negativa, de -14,5 mV a -6,67 mV, na superfície celular. Neste estudo também foi evidenciado uma diminuição da carga negativa de partículas de areia após tratamento com biossurfactantes (-15 mV a -6.7 mV), que foi relacionando a uma maior taxa de dessorção do microrganismo em ensaios de transposição em coluna empacotada devido à repulsão mútua entre as células e as partículas (HUA *et al.*, 2003).

Processos de aderência de leveduras do gênero *Candida* a superfícies plásticas têm sido governados predominantemente por forças hidrofóbicas caracterizadas como forças atrativas de London van der Waals (VAN OSS *et al.*,1980). Embora, alguns autores relatem a contribuição significativa de forças eletrostáticas para processos de adesão (KLOTZ *et al.*, 1995). No presente estudo, foi observado que a adsorção do biossurfactantes provoca um aumento da carga positiva da superfície de células de *C. albicans*. A modificação da carga da superfície celular poderia explicar em parte a baixa interação das células com a superfície do poliestireno nos ensaios de formação de biofilmes. A adesão e a formação de biofilmes pelas leveduras seria afetada como consequência do aumento de forças repulsivas entre células e superfície do plástico. Tem sido demonstrado que plásticos como polistireno apresentam vários graus de negatividade superficial (MARSHALL *et al.*,1976). Partículas com cargas superficiais mais positivas podem levar a uma repulsão elétrica de células microbianas com características superficiais menos negativas.

5.22 Teste de citotoxicidade do biossurfactante em células de mamífero

Nos ensaios de determinação do efeito citotóxico do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 em células da linhagem HEK 293, não foram observadas diferenças significativas nos valores de redução da viabilidade celular nas concentrações de 0,25 a 1 mg/mL ($P < 0,05$) (figura 18). Entretanto, foi observado que concentração de 15 mg/mL provoca uma redução de 100% da viabilidade das células. O fator de correlação (Coeficiente de Pearson) entre as concentrações do biossurfactante utilizadas e os valores de porcentagem de viabilidade celular foi calculado em $P = 0,925$ ($P < 0,05$). Indicando uma correlação estreita entre concentração do biossurfactante e a morte celular, demonstrando um efeito citotóxico dose dependente. A concentração Efetiva (EC_{50}) foi estimada em 3.843 $\mu\text{g/mL}$, a partir dos valores em percentuais de viabilidade celular.

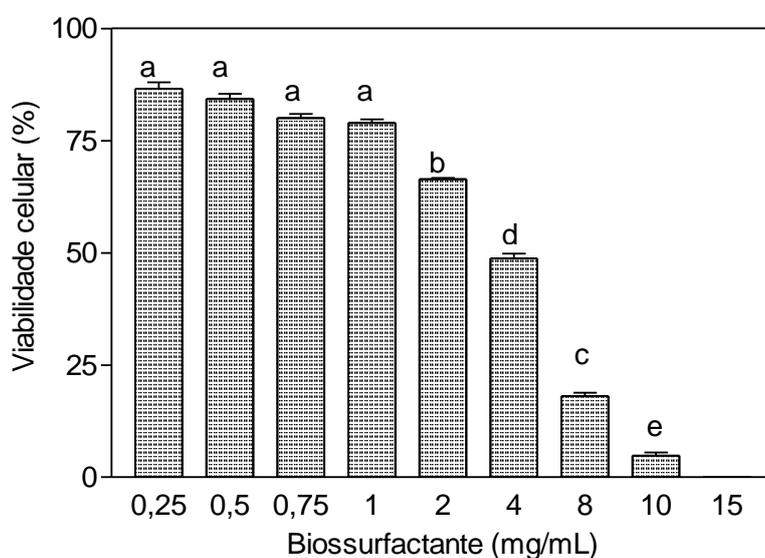


Figura 18: Viabilidade de células HEK193 na presença de diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72.

Os resultados deste estudo indicam uma possível interação entre o biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 nas concentrações acima de 1 mg/mL e a membrana celular da linhagem testada (HEK293A), que pode ser explicada pela presença de vários tipos de ácidos graxos existentes na estrutura do biossurfactante. Poucos estudos foram feitos a fim de determinar a citotoxicidade de surfactantes e biossurfactantes em células de mamíferos. Os

resultados obtidos nestes estudos mostraram que existe um efeito de toxicidade variável de acordo com o surfactante utilizado nos ensaios. Entretanto, foi relatado que os biossurfactantes podem apresentar valores de citotoxicidade bem menores quando comparados com os surfactantes sintéticos. A citotoxicidade dos surfactantes e biossurfactantes parece estar ligada a interação destes com os fosfolípidios das membranas celulares, tendo como conseqüência a lise celular (ARÁNZAZU *et al.*, 1990).

Dehghan-Noudeh *et al.* (2005) compararam o efeito da concentração do biossurfactante tipo lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com surfactantes sintéticos (SDS, BC, TTAB, e HTAB) na lise de eritrócitos humanos, e constaram que a eficiência hemolítica dos surfactantes catiônicos (TTAB e HTAB) é superior a apresentada pelo surfactante aniônico SDS e o biossurfactante. Entretanto, os ensaios mostraram que 95% de lise dos eritrócitos ocorre na concentração de 0,5 mg/mL para todos os surfactantes testados incluindo o lipopeptídeo microbiano.

Kojima *et al.* (1995), também compararam a citotoxicidade e os valores de EC_{50} de diferentes surfactantes sobre culturas de células de mamíferos. Neste estudo os pesquisadores observaram que a citotoxicidade é variável de acordo com o tipo de surfactante e a linhagem celular utilizada nos ensaios. O menor valor de EC_{50} (0,33 μ g/mL) foi identificado para o surfactante ABDAC (*Alkyl Benzyl Dimethyl Ammonium Chloride*) adicionado às células da linhagem NREC. Sendo que os maiores valores de EC_{50} (1000 μ g/mL e 825 μ g/mL) foram observados para os surfactantes Tween 20 e SLAE (*Sucrose Lauric Acid Ester*) adicionados às culturas de células da linhagem 3T3.

Trabalhos com biossurfactantes têm demonstrado o efeito citotóxico destes compostos sobre linhagens de células tumorais. No entanto, estes trabalhos enfocam apenas aplicações terapêuticas destas moléculas. Dentre os biossurfactantes utilizados em ensaios contra células tumorais, os glicolípídeos são os mais citados na literatura. Os glicolípídeos tensoativos manosileritrol-lípídeos (MEL), extraídos e purificados a partir da cultura de células de *Candida antarctica* T-34, mostraram-se efetivos na inibição de células da linhagem B16 de melanoma de rato. A aplicação de MEL na concentração de 10 μ M causa condensação da cromatina e fragmentação da molécula de DNA, levando à apoptose celular (ZHAO *et al.*, 1999).

ISODA *et al.* (1997) também mostraram que os biossurfactantes manosileritritol-lipídeos (glicolipídeos) inibem a proliferação das células da linhagem K562, as quais exibiu um decréscimo significativo da atividade de fosforilação intracelular da enzima tirosina. Por sua vez, os surfactantes lipídeos-poliol produzidos por *Aureobasidium* sp. mostraram um efeito anti-proliferativo contra células cancerosas de pulmão humano (linhagem A549) em concentrações inferiores a 10 mg/L (ISODA e NAKAHAKA, 1997).

5.23 Ensaio de inibição da adesão de *C. albicans* em células epiteliais bucais pelo biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA 72 e alteração da hidrofobicidade celular

No presente estudo, o isolado de *C. albicans* 18 obtido da cavidade oral de usuário de prótese total foi submetido a ensaios de inibição de adesão em células epiteliais bucais (CEB) pelo biossurfactante produzido pela levedura *T. montevidense* CLOA72 (figura 19). A inibição da adesão de *C. albicans* a CEB foi avaliada quantificando-se o número de células aderidas na presença e na ausência do biossurfactante. O número médio de leveduras aderidas a 50 CEB sem adição de biossurfactante foi de $257 \pm 1,41$. Nos ensaios utilizando o biossurfactante, efeito significativo do biossurfactante na redução da adesão só foi observada para concentrações acima de 2 mg/mL (Comparadas pelo Teste de Tukey, com $P < 0,05$), quando o número de células aderida a CEB diminuiu para $197 \pm 19,79$. Para concentrações superiores a 6 mg/mL, a redução foi maior, variado de 71,6% (6 mg/mL) para 85,2% para as células tratadas com 20 mg/mL do biossurfactante.

A hidrofobicidade da superfície celular da levedura *C. albicans* foi determinada após o crescimento das células em meio Sabouraud líquido adicionado de biossurfactante na concentração de 16 mg/mL. Os valores de hidrofobicidade celular no ensaio sem adição de biossurfactante variaram de 2,11% a 22,89%, para os tempos de 0 h e 24 h, respectivamente. Para as células incubadas com adição de biossurfactante a hidrofobicidade celular variou de 2,11% a 3,12%, para os tempos de 0 h e 24 h, respectivamente.

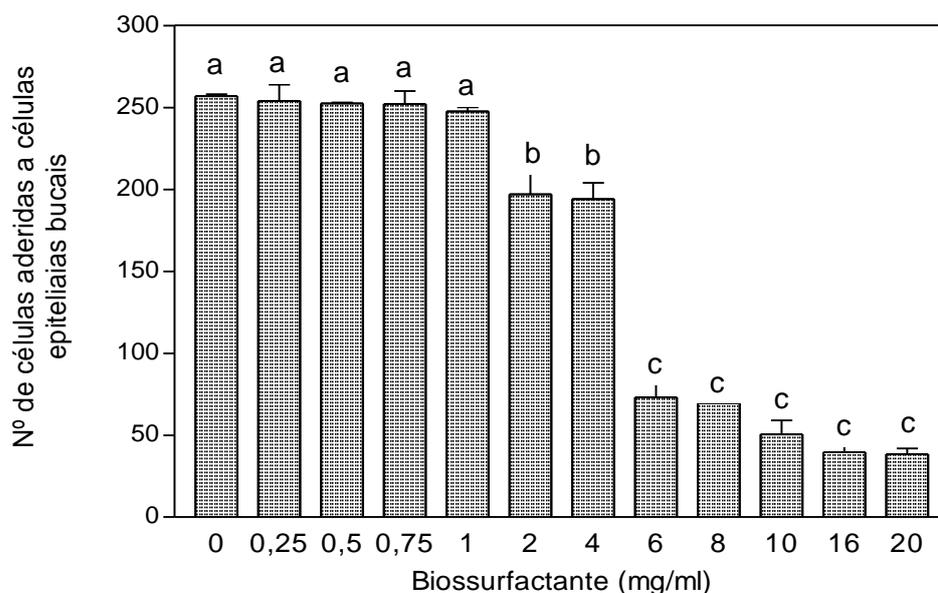


Figura 19: Número de células de *Candida albicans* 18 aderidas a CEB na presença de varias concentrações do biossurfactante produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA72. Ensaio realizado em 3 repetições.

Os baixos valores de hidrofobicidade celular em *C. albicans* 18 provavelmente após a incubação na presença de biossurfactante podem estar relacionados a uma diminuição da formação de hifas (dados não mostrados). Em adição, a inibição da formação de hifas pode estar relacionada com os baixos valores de adesão de *C. albicans* a células epiteliaias bucais observados para a linhagem de *C. albicans* 18. Vários fatores podem contribuir para a patogenicidade de *C. albicans*, entre os quais a capacidade de adesão a células epiteliaias da mucosa do hospedeiro seja um pré-requisito para colonização e infecções subseqüentes. (SAMARANAYAKE e MAC FARLANE, 1982). Tal mecanismo permite que o microrganismo evite o deslocamento pela ação mecânica da saliva (ELLEPOLA *et al.*, 1999). Diversos autores mostraram que a formação de tubos germinativos e a formação de hifas estão relacionadas ao aumento da hidrofobicidade celular de *C. albicans*, que tem como consequência uma colonização de tecidos do hospedeiro (TRONCHIN *et al.*, 1888; RODRIGUES *et al.*, 1999). Por sua vez, foi demonstrado que a inibição de

formação de tubos germinativos por agentes antifúngicos reduz significativamente a capacidade adesiva de *C. albicans* a células epiteliais (SOBEL e OBEDEANU, 1983).

Em adição, mais estudos são necessários para caracterizar melhor o processo de inibição da adesão de *C. albicans* 18 a células epiteliais desencadeado pelo biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72. Uma vez, que a linhagem estudada apresenta uma baixa hidrofobicidade celular superficial, outros fatores tem que ser considerados, como inibição da expressão de adesinas específicas na superfície celular e aumento das forças repulsivas eletrostáticas.

5.24 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do biossurfactante produzido por CLOA72 em células de *C. albicans*

Considerando que muitos biossurfactantes produzidos por diferentes tipos de micro-organismos já foram relatados por exibirem atividade antimicrobiana, o biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 foi avaliado quanto a este efeito. Suspensões de *C. albicans* 18 foram tratadas com diferentes concentrações do biossurfactante e as células incubadas por 48 h (figura 20). Os ensaios de CIM mostraram não haver inibição do crescimento de *C. albicans* para todas as concentrações testadas. A determinação da absorbância das suspensões de *C. albicans* 18 após 48 h indicou não haver diferenças significativas entre os valores quando comparados pelo Teste de Tukey.

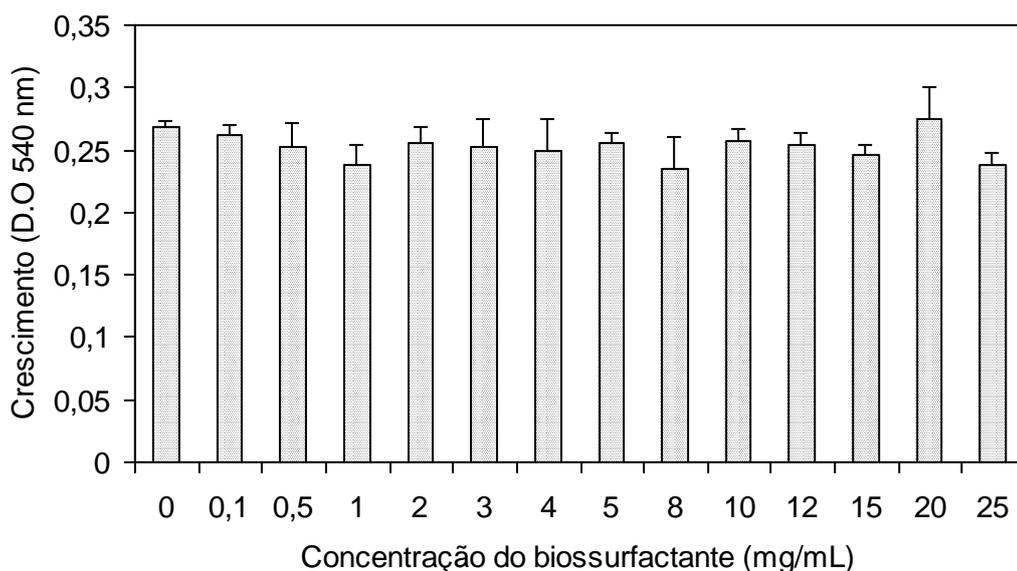


Figura 20 - Efeito dos biossurfactantes produzido por *T. motevideense* CLAO72 no crescimento de *C. albicans* 18 em diferentes concentrações. Ensaio realizado após 24 h de incubação a 35 °C e em três repetições.

Os resultados de crescimento de *C. albicans* 18 em diferentes concentrações do biossurfactante indicaram que a redução da inibição de adesão do microrganismo a células epiteliais bucais provavelmente deve as interações do surfactante com a superfície celular de *C. albicans* ou com a superfície das células epiteliais, uma vez que este não apresenta efeito antifúngico considerável.

6. CONCLUSÕES

6.1- Os biossurfactantes produzidos pelas leveduras *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLA70 e *T. montevidense* CLOA72 foram predominantemente de natureza glicolipídica. As análises indicaram uma prevalência de ácidos graxos contendo de 16 a 18 carbonos. Bem como, presença dos açúcares xilose, ribose, manose, glicose, arabinose e galactose.

6.2- *Trichosporon loubieri* CLV 20, *Geotrichum* sp. CLOA 40, *T. montevidense* CLA70 e *T. montevidense* CLOA72 produzem biossurfactantes e emulsificantes durante a fase de crescimento exponencial da cultura utilizando óleo de girassol como fonte principal de carbono.

6.3- A fonte de carbono utilizada pela levedura *T. montevidense* CLOA72 durante o crescimento influencia a produção de emulsificantes, sendo glicose e óleo de girassol os mais efetivos entre os compostos testados.

6.4- O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72, apresentou estabilidade frente a diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de sais. Também, foi constatado que o biossurfactante apresentou uma ampla faixa de atividade emulsificante contra diferentes substratos hidrofóbicos.

6.5- A atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 utilizando óleo de girassol é persistente por pelo menos 30 dias.

6.6 - O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 inibe a formação de biofilmes pela levedura *C. albicans* CC sobre substratos plásticos.

6.7 – O mecanismo de diminuição da formação de biofilmes pela adição do biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 não envolve a diminuição da hidrofobicidade das células de *C. albicans* CC.

6.8 – O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 não inibe o crescimento de *C. albicans* CC nas concentrações de 0,130 a 1 mg/mL, nem foi deletério para as células para HEK 293A na concentração de 1 mg/mL.

6.9- O tratamento com biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 aumenta a carga líquida da superfície de *C. albicans* CC. Esta alteração pode contribuir para os efeitos de inibição da adesão do microorganismo em superfícies plásticas.

6.10 – O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 inibe a adesão de células de *C. albicans* 18 às células epiteliais bucais humanas. Entretanto, o mecanismo de inibição da adesão de *C. albicans* 18 às células epiteliais bucais humanas pela adição do biossurfactante CLOA72 não envolve a diminuição da hidrofobicidade das células.

6.11 - O biossurfactante produzido por *T. montevidense* CLOA72 não inibe o crescimento de *C. albicans* 18 nas concentrações de 0,1 a 25 mg/mL. Indicando, que a inibição da adesão às células bucais não envolve um efeito fungicida do biossurfactante estudado.

5. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

AL-TAHHAN. R.A.; SANDRIN, T.R.; BODOUR, A. A.; MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, v, 66, p. 3262-3268, 2000.

AMARAL, P.F.F.; SILVA, J.M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Proc. Biochem.*, v. 41, p.1894–1898, 2006.

ARÁNZAZU, P,M.; OSTALAZA, H.; GONI, F.M.; BARBERÁ-GUILLEM, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 40, p. 1323-1328, 1990.

ASMER, H.J; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V. 65: p. 1460–1466, 1998.

BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BENERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 7, p. 80-84, 1991.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA. S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*v. 53, p. 495–508, 2002.

BARATHI, S. & VESUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ. Inter.*, v. 26, p. 413-416, 2001.

BARUA, P. K.; BHAGAT, S.D.; PILLAI, K.R.; SINGH, H.D.; BARUAH, J.D.; IYENGAR, M.S. Comparative utilization of paraffins by a *Trichosporon* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 20, p. 657-661, 1970.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *J Food. Eng.*, v. 54, p. 283–288, 2002.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.*, v. 8, p.93-9, 1987.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Coll. Surf.*, v. 152, p. 41-52, 1999.

BOIVIN, P & MALANDA, M. Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *MBAA Tech. Q.*, v. 34, p. 96–101, 1997.

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, A. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *J. Appl. Microbiol.*, v. 98, p. 456-463, 2005.

BOUCHEZ-NAÏTALI, M.; BLANCHET, D.; BARDIN, V.; VANDECASTEELE, J.P. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology.*, v, 147, p. 2537-2543, 2001.

BOUTROU, R., GUÉGUEN, M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Inter.J..Food. Microbiol.*, v. 102, 1–20, 2005.

BRADFORD, M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-258, 1976.

BUSSCHER, H.J.; VAN HOOGMOED, C, GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.I.; VAN DER KUIJL-BOOIJ, M.; VAN DER MEI, H. C. *Streptococcus thermophilus*

and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 3810-381, 1997.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; RAMOS, S. A. F.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS- JUNIOR, M. A.; LIMA- FILHO, J. L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, p. 191–194, 2003.

CAMEOTRA, S.S. & MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMERON, D.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 54, p. 1420-142, 1988.

CARILLO, C.; TERUEL, J.A.; ARANDA, F.J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1611, p. 91-97, 2003.

CASTELLAN, G. W. *Fundamentos de Físico – Química*, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A.;1986.

CAVALERO, D.A & COOPER, D.G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.*, v. 10, p. 31-41, 2003.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.*, v. 83, p. 5385–5394, 2001.

CHRZANOWSKI, L.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Relation between *Candida maltosa* hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 21, p. 1273-1277, 2005.

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

COOPER, D. G. & GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p. 224-229, 1987.

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

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B, KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 42, p. 408-412.1981.

DANIEL, K.Y. S.; RICHARD D, A.; ALBERTO, N.; THOMAS, A. F. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnol. Lett.*, v. 26, p. 1241–1245, 2004.

DEHGHAN-NOUDEH G., HOUSAINDOKHT M., BAZZAZ, B.S., Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *J. Microbiol.*, v. 43, p. 272-276, 2005.

DESAI, J.D. & BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 61, p. 47–64, 1997.

DESAI, J., DESAI, A. Production of biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), *Biosurfactants*, first ed., Production properties applications., v. 48. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 65–97, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELLEPOLA, A.N., PANAGODA, G.J., SAMARANAYKE, L.P. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 14, p. 358–363, 1999.

FUKAZAWA, Y. & KAGAYA, K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol*, v., 35, p. 87–99, 1997.

GUEGUEN, M. Contribution to knowledge of *Geotrichum candidum* and in particular to its variation. Consequences for dairy technology. Ph.D. Thesis, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France pp 487, 1984.

GUTNICK, D.L.; SHABTAI, Y. Exopolysaccharide bioemulsifiers 1987, in Biosurfactants and Biotechnology, Ed by Kosaric, N *et al.*; Marcel Dekker, In, New York and Basel, pp 211-246, 1987.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB4004 from waste frying oil. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 379–387, 2000.

HAWSER.; S.P & DOUGLAS, J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antim. Agen. Chem.*; v. 39, p. 2128–2131, 1995.

HAYES, M.E.; NESTAAS, E.; HREBENAR, K.R. Microbial surfactants. *Chemtech.*, p. 239–243, 1986.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells. *Mycoses.*, v. 50, p. 391-396, 2007.

HILDEBRAND, P. D. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Can. J. Plant Pathol.*, v. 11, 205-224, 1989.

HILDEBRAND, P.D.; BRAUN, P.G.; MCRAE, K.B. Role of the biosurfactant viscosin in broccoli head rot caused by a pectinolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*, *Can. J. Plant. Pathol.* v. 20, p. 296-303, 1998.

HOMMEL, R.; STUWER, O.; STUBER, W.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H.P.;. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 26, p.199–205, 1987.

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of *n*-alkanes. *Water Res.*, v. 37, p. 4143-4150, 2003.

IRWIN, P.L.; BROUILLETTE, J.N.; OSMAN, S.F.; HICKS, K.B., Cyclomaltooligosaccharide binding and solubilization of hydroxyfatty acid matrices in aqueous solution: calorimetric titration and C-13 NMR investigations of molecular recognition. *Carbohydr. Res*, v. 311, p. 37-49, 1998.

ISODA H. & NAKAHARA, T Antiproliferative effect of polyol lipids, 3,5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decenoyl esters of arabitol and mannitol on lung cancer cell line A549. *J. Ferment. Bioeng.* v. 84, p. 403-406, 1997.

ISODA H.; SHINMOTO H.; KITAMOTO D.; MATSUMURA, M.; NAKAHARA, T. Differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids.* v. 3, p. 263-271, 1997.

KAKUGAWA K.; TAMAI, M.; IMAMURA, K.; MIYAMOTO, K.; MIYOSHI, S.; MORINAGA, Y.; SUZUKI, O.; MIYAKAWA, T. Isolation of yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11, novel producer of mannosylerythritol lipid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 66, p.188-91, 2002.

KAPLAN, N.; ZOSIM, Z.; ROSENBERG, E. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p. 440–446, 1987.

KASZYCKI, P.; CZECHOWSKA, K.; PETRYSZAK, P.; MIĘDZOBRODZKI, J.; PAWLIK, B.; KOŁOCZEK, H. Methylophilic extremophilic yeast *Trichosporon* sp.; a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. *Acta. Biochim. Pol.*, v. 53, p. 463–473, 2006.

KIM, H. S.; YOON B.D.; CHOUNG, D. H.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Characterization of a biosurfactant, MEL, produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 52, p. 713–721, 1999.

KIM, S.Y.; OH, D.K.; LEE, K.H.; KIM, J.H. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 48, p. 23-26, 1997.

KIM, S.Y.; OH, D.K.; LEE, K.H.; KIM, J.H. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 48, p. 23-26, 1997.

KIMURA, L.H.; PEARSHALL, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. p, 64-68, 1978.

KITAMOTO D., YANAGISHITA, H., SHINBO, T., NAKANE, T., KAMISAWA, C.; NAKAHARA, T. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotechnol.*, v. 29, p. 91-96, 1993.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Bios. Bioeng.*, v. 94, p. 187–201, 2002.

KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, T.G.; SAAKI, A.; TAKEYAMA, Y-I.; IDEMOTO, Y.; KOURA, N.; YANAGISHITA, H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnol. Lett.*, v. 23, p. 1709-1714, 2001.

KITAMOTO, D.; NAKANE, T.; NAKAO, N.; NAKAHARA, T.; TABUCHI, T. Intracellular accumulation of mannosylerythritol lipids as storage materials by *Candida antarctica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 54, 768-772, 1992.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA H.; SHINBO T., NAKANE T.; KAMISAWA C.; NAKAHARA, T. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotechnol.*, v. 29, p. 91-96, 1993.

KLOTZ, S.A.; DRUTZ, D.J.; ZAJIC, J.E. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.*, v. 50, p. 97-101, 1985.

KOJIMA, H.; HANAMURA, A.; SATO, A.; KONISHI, H. Comparison of cytotoxicity of surfactants on a range of mammalian cells cultured under various conditions. *AATEX.*, v. 3, p. 111-120, 1995.

KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeast, a Taxonomic Study*, 4th ed.; Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokio, 420 pp, 1998.

KURTZMAN, C.P. & ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, v. 73, p. 331–371, 1998.

KUYUKINA, S.M.; IVSHINA, I.B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S.A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J. Microbiol. Met.*, v. 46, p. 149–156, 2001.

LACHANCE, M.A., BOWLES, J.M., STARMER, W.T., BARKER, J.S.F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can. J. Microbiol.*, v. 45, 172-177, 1999.

LAEMMLI U, K, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LÃAS HERAS-VAZQUEZ, F.J.; MINGORANCE-CAZORLA, I.; CLEMENTE-JIMENES, J.M.; RODRIGUEZ-VICO, F. Identification of yeast species from Orange fruit and juice by RFLP and sequence analyses of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribe spacers. *FEMS Yeast Res.*, v. 3, p. 3-9, 2003.

LEUNISSEN, M.E.; VAN BLAADEREN, A.; HOLLINGSWORTH, A.D.; SULLIVAN, M.T.; CHAIKIN, P.M. Electrostatics at the oil–water interface, stability, and order in emulsions and colloids. *P.N.A.S.*, v.104, p. 2585-2590, 2007.

LI, X. & XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, v. 149, p. 353–362, 2003.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; MARTINEZ, J.P. SENTANDREU, R. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 2324-2332, 1991.

LUNA-VELASCO, M.A., ESPARZA-GARCIA, F., CANIZARES-VILLANUEVA, R.O., RODRIGUEZ-VASQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process. Biochem.*, v. 42, 310–314, 2007.

LYON, P. J. Prevalência, fatores de virulência. Suscetibilidade a drogas antifúngicas e variabilidade genética de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral de usuários de prótese total de indivíduos controles. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, pp-94, (2006).

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 52, p. 101-121, 2003.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Quim. Nov.*, v. 24, p. 87-93, 2001.

MARSHALL, K. C. Interfaces in microbial biology, Harvard University Press, Cambridge, p. 35-43. 1976.

MATSUYAMA, T.; SOGAWA, M.; NAKAGAWA, Y. Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 61, p.243-246, 1989.

MIDDELHOVEN, W.J.; SCORZETTI, G.; FELL, J.W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T.gamsii*. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, V. 54, p. 975–986, 2004.

MIDDELHOVEN, W.J.; SCORZETTI, G.; FELL, J.W. *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubieri/luibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Res.* v. 1, p. 15-22, 2001.

MIRANDA, T.T. Leveduras do gênero *Candida* e a periodontite apical primária: prevalência, diversidade e susceptibilidade às pastas de hidróxido de cálcio. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, pp-129, (2007).

MORITA, T.; MASAOKI, K.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Physiological differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 74, p. 307-315, 2007.

MORRISON, W. R & SMITH, L. M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron tri-fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, v. 5, p. 600–608, 1964.

MOZES N, AMORY, D.E.; LEONARD, A.J.; ROUXHET, P. G. Surface properties of microbial cells and their role in adhesion and flocculation. *Colloid. Surf.*, v. 42, p. 313-329, 1989.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollution.*, v. 133, p. 183-189, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard (NCCLS document M27-A2) Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

NEU, T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.*, v. 60, p. 151-166, 1996.

NGUYEN, M. H.; PEACOCK, J.E., TANNER, D.C.; MORRIS, A.J.; NGUYEN, M.L.; SNYDMAN, D.R.; WAGENER, M.M.; YU, V.L. Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. *Arch. Intern. Med.*, v. 155, p. 2429-2435, 1995.

NITSCHKE, M & PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quim. Nova.*, v. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M & PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* using cassava wastewater. *Biores. Technol.*, v. 97, p. 336-341, 2006.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 32, p. 485-489, 1990.

O'BRIEN, P.; O'KIELY, P.D.; FORRISTAL, FULLER, H.T. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands, *FEMS Microbiol.*, v. 247, p. 131-135, 2005.

PALLA, B.J & SHAH, D.O. Stabilization of high ionic strength slurries using source: surfactant mixtures: molecular factors that determine optimal stability. *J. Colloid. Inter. Scie.*, v. 256, p. 140-152, 2002.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWA, A.; DIUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotechnol.*, v. 92, p. 287-294, 2002.

PEPI, M.; CESARO, A.; LIUT, G.; BALDI, F. An Antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiol Ecol.*, v. 53, 157–166, 2005

PHILP, J.C., KUYUKINA, M.S., IVSHINA, I.B., DUNBAR, S.A., CHRISTOFI, N., LANG, S; WRAY, V. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,v. 59, p. 318–324, 2002.

PIJANOWSKA, A.; KACZOREK, E.; CHRZANOWSKI, Ł.; OLSZANOWSKI, A. Cell hydrophobicity of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillaya saponins, *World J. Microb. Biot.*, v. 23, p. 677–682, 2007.

PINHO, J.J.R. G. & STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões. *Cosmet. Toiletries.*, v. 10, pp. 44–56, 1998.

PIRETTI, M.V.; PAGLIUCA, G.; VASINA, M. Transmethylation of neutral and polar lipids with NaBH₄ in the presence of NaOH. *Chem. Phys. Lipids.*, v. 47, p. 149-153, 1988.

POTTIER, I.; GENTE, S.; VERNOUX, J.P.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.126, 327-332, 2008.

RAU, U.; HAMMEN, S.; HECKMANN, R.; WRAY, V., Lang, S. Sophorolipids: a source for novel compounds. *Indus. Crops. Prod.*, V. 13, p 85–92, 2001.

RAU, U.; NGUYEN, L. A.; SCHULZ, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; ROEPER, H.; KOCH, H. LANG, S. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 66, p. 551–559, 2005.

REKHARSKY, M., V. & INOUE, Y., Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Rev.*, v. 98, p. 1875-1917, 1998.

RODRIGUES, A.G.; MFIRDH, P.A.; PINA-VAZ, C.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; FONSECA, A.F. Germ tube formation changes surface hydrophobicity of *Candida* cells. *Infec. Dis. Obst.Gynecol.*, v. 7, p. 222-226, 1999.

RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A., VAN DER MEI, H.C.; OLIVEIRA, R. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloid. Surf. B.* v. 53, p. 105–112, 2006.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; VAN DER MEI, H.C.; OLIVEIRA, R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloid Surf. B.* v. 49, p. 79-86, 2006.

RON, Z.E. & ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSENBERG, E. & RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons; a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 9, p.29-33, 1980.

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

SAM MILLAN, R.; EZKURRA, P.; QUINDOS, G.; ROBERT, R.; SENET, J.M.; PONTON, J. Effect of monoclonal antibodies directed against *Candida albicans* cell wall antigens on the adhesion of the fungus to polystyrene. *Microbiology.*, v. 142, p. 2271-227, 1996.

SAMARANAYAKE, I.P. & MAC FARLANE, T. W. Factors affecting the in vitro adherence of fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch. Oral. Biol.*, v. 27, p. 873-82, 1982.

SAMPAIO, J.P. Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Can. J. Microbiol.* v., 45: 491-512, 1999.

SANTA-ANA, L.M.; SEBASTIAN G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, S; PEREIRA Jr, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactans from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in environments. *Braz. J.Chem. Engin.*, v. 19, p. 159-166, 2002.

SANTOS, V.L. & LINARDI, V.R. Phenol degradation by yeast isolated from industrial effluents. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 47, p. 213-221, 2001.

SARUBBO, L.A.; MOURA, J.; TAKAKI, G.M.C. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002 *Elec. J. Biotechnol.*, v. 9, p. 400-406, 2006.

SCHIPPERS, C.; GESSNER, K.; MULLER, T.; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J. Biotechnol.*, v. 83, p. 189–198, 2000.

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

SINGH, H. D.; BARUA, P.K.; CHAKRAVARTI, M.; BARUAH, J.N.; IYENGAR, M.S. Utilization of gas oil in the production of single cell protein. I1. Studies on the growth of a *Trichosporon* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 16, p. 91-100, 1970.

SOBEL J.D. & OBEDEANU, N. Effects of sub-inhibitory concentrations of ketoconazole on *in vitro* adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, v. 2, p. 445–52. 1983.

SOUZA, M. A. Desemulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos, Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, (2003).

SPOECKNER, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; LANG, S. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 51, p. 33-39, 1999.

SUN, X. X.; CHOI, J.K.; KIM, E.K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, v. 304, p. 35-49, 2004.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAIPONG, T.; CHOTELERSAK, K.; ARUNRATTIYAKORN, P.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermo tolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 96, p. 588–592, 2004.

TOREN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.*, v: 67, p. 1102–1106, 2001.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J.P.; ROBERT, R.J.; SENET, M. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect. Immun.*, v. 56:1987-1993, 1988.

TULLOCH, A.P.; SPENCER J.F.P.; GORIN, P.A.J. The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*: structures of the hydroxy fatty acids obtained by the fermentation of fatty acids and hydrocarbons. *Can. J. Chem. Rev.*, v. 40, p. 1326-1338, 1962.

VAN OSS, C.J.; ABSOLOM, D.R.; NEUMANN, A.W. The hydrophobic effect: essentially a Van der Waals interaction. *Colloid. Polymer. Sci.*, v. 258, p. 424-427. 1980.

VANCE-HARROP, M.H.; GUSMÃO, N.B.; TAKAKI, G.M.C. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Braz. J. Microbiol.*, v. 34, p. 120-123, 2003.

VEGA-RODRIGUES, A.; PINEIRO, A.; PEREZ-CASAS, S. Thermodynamics of the interaction between hydroxypropyl-alpha-cyclodextrin and alkanols in aqueous solutions. *Thermochimi. Acta.*, v. 405, p. 109-115, 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: a guide to methods and applications. Eds. Academic Press, 1990.

WILLUMSEN, P.A & KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation.*, v. 7, p. 415-423, 1997.

YAMANE, T. Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, v. 64, p. 1657-1662. 1987.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. (Ed.). The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier, p. 77-100, 1998.

ZHANG Y. & MILLER R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant), *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 3276-3282, 1992.

ZHANG, J.; LEE, S.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. Surface properties of emulsan-analogs. *J. Chem. Tech. Biol.*, v. 74, p. 759-765, 1999.

ZHAO, X.; WAKAMATSU, Y.; SHIBAHARA, M.; NOMURA, N.; GELTINGER, C.; NAKAHARA, T.; MURATA T.; YOKOYAMA K.K. Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer Res.*, v. 59, p. 482-486, 1999.

ZINJARDE, S.; CHINNATHAMBI, S.; LACHKE, A.H.; PANT, A. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 35 89 using a modified mini isoelectric focusing unit. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 117-121, 1997.

ZOSIM, Z.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 281-292, 1982.

ANEXO 1- Testes bioquímicos e fisiológicos dos isolados deste estudo

Testes	Grupos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Glicose	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
2. Galactose	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
3. L-sorbose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
4. Maltose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
5. sucrose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6. Cellobiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7. Trehalose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8. Lactose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9. Melibiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10. Rafinose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11. Melitose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12. Amido solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. D-xilose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14. L-arabinose	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
15. D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. D-ribose	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
17. L-ramnose	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
18. Etanol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
19. Glicerol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
20. Eritritol	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
21. Galactitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22. D-manitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
23. D-glucitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
24. Salicina	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
25. DL-lactato	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
26. Succinato	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
27. Citrato	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28. Metanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29. Hexadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30. Glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
31. Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32. Acetona	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
33. Etilacetato	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
34. Isopropanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35. Gluconato	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
36. N-acetilglucosamina	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S/aa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
YCB branco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YNB-branco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Lisina	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
10% NaCl	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Carbonato	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ácido acético	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
50 % glicose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Compostos amilóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Crescimento 37 °C	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento 40 °C	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

ANEXO 2- Artigo 1

Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevideense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents

ANEXO 3- Artigo 2

Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry