

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR *Candida guilliermondii*

Sharline Florentino de Melo Santos^{1*}, Andressa Laís Maria de Melo², Alany de Oliveira Lima³, Livia Maria Santana Pereira³, Felipe Augusto Santos³, Nathália Miranda de Medeiros³, Milena Gomes Barbosa da Silva³

1. Professora Adjunto. *Correspondência: Departamento de Engenharia Química (DEQ), Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, CEP: 58059-900, João Pessoa-PB. email:sharlinefm@hotmail.com

2. Discente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

3. Discente do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

RESUMO

Biossurfactantes são surfactantes produzidos por microrganismo, eles têm sido amplamente estudados devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e a sua aceitabilidade ecológica e estabilidade. Eles são capazes de reduzir tensões superficiais e interfaciais, além de serem capazes de formar emulsões estáveis. O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento da levedura *Candida guilliermondii* a partir de diferentes fontes de carbono visando a produção de biossurfactante. A produção de biossurfactante foi realizada por de um processo de fermentação submersa em incubadora rotativa *shaker* (30°C, 200 rpm, 96h) utilizado um meio mineral acrescido da fonte de carbono selecionada, sendo elas o melaço de cana, suco de caju e suco de abacaxi. Para a determinação da presença de biossurfactantes foram realizados testes de índice de emulsificação. Os resultados obtidos mostraram que as leveduras estudadas apresentaram bom crescimento utilizando todos os substratos utilizados. Os melhores parâmetros cinéticos de crescimento foram obtidos utilizando suco de caju como fonte de carbono, sendo eles $\mu_x = 0,178 \text{ h}^{-1}$, $T_g = 3,89 \text{ h}$, $P_x = 0,126 \text{ g.L}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e $Y_{x/s} = 0,528 \text{ g/g}$. Os melhores índices de emulsificação (IE) foram obtidos utilizando suco de abacaxi como fonte de carbono, sendo eles 74,02% para óleo de motor e 67,54% utilizando óleo de soja como composto hidrofóbico. Os índices de emulsificação obtidos comprovaram a presença de substâncias tensoativas, mostrando assim, que o bioprocesso desenvolvido cumpre com o que foi proposto.

Palavras-chave: tensoativos, melaço, caju, abacaxi.

EVALUATION OF THE PRODUCTION OF BIOSURFACTANT FROM DIFFERENT CARBON SOURCES BY *Candida guilliermondii*

ABSTRACT

Biosurfactants are surfactants produced by microorganisms and they have been widely studied nowadays due to their biodegradability, low toxicity, and ecological acceptability and stability. They are able to lower the surface and interfacial tension between different phases, and form stable emulsions. The objective of this work was to evaluate the growth of *Candida guilliermondii* yeast from different carbon sources for the production of biosurfactant. The



biosurfactant production was carried out by a submerged fermentation process in a rotatory shaker (30 °C, 200 rpm, 96h), using a mineral medium plus the selected carbon source, such as cane molasses, cashew apple juice and pineapple juice. For the determination of the presence of biosurfactants, emulsification index tests were performed. The obtained results showed that the studied yeasts showed good growth using all of the tested substrates. According to the results, the best carbon source to improve the growth was the cashew apple juice because it has the nexts growth parameters: $\mu_x= 0,178 \text{ h}^{-1}$, $T_g= 3,89 \text{ h}$, $P_x= 0,126 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ and $Y_{x/s}= 0,528$. But, the best source to improve the emulsification index was the pineapple juice that was 74,02% to motor oil and 67,54% to soybean oil. The obtained emulsification indexes verified the presence of tensoactive substances, showing that the studied and developed bioprocess complies with what was proposed.

Keywords: surfactant, molasses, cashew, pineapple.

INTRODUÇÃO

Os surfactantes, também chamados de tensoativos, são moléculas anfipáticas compostas de uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar). A porção polar pode ser iônica, não-ionica ou anfotérica e a porção apolar, normalmente, é uma cadeia hidrocarbonada (1). Eles constituem uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais para uma vasta variedade de aplicações, como emulsificação, detergência, solubilização, dispersão de fases, lubrificação, capacidade de formar espumas e umidificação (1-3).

A principal forma de obtenção desses compostos é a via química, mas a rota biológica tem se mostrado promissora. Os processos biotecnológicos para obtenção desses compostos levam em consideração a capacidade que muitos microrganismos possuem de, ao metabolizarem moléculas orgânicas, produzirem e excretarem em seu meio de crescimento moléculas com propriedades redutoras de tensões superficiais. O produto de tais bioprocessos é denominado de biossurfactante (2).

A sua estrutura consiste em uma molécula com uma parte hidrofílica constituída de aminoácidos ou peptídeos, mono-, di-, ou polissacarídeo; e a sua parte hidrofóbica é constituída de ácidos graxos, saturados ou insaturados (4). Os biossurfactantes são produzidos principalmente por microrganismos de crescimento aeróbico em meio aquoso a partir de uma matéria-prima fonte de carbono, como por exemplo, carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou misturas dos mesmos (5).



Os surfactantes, sejam eles sintéticos ou de origem biológica, podem ser utilizados em processos de biodegradação, pois eles interagem com determinados compostos aumentando a sua solubilidade em água. Assim, a presença de surfactantes aumentam a disponibilidade de contaminantes aos microrganismos e como consequência, à biodegradação (6).

A produção de biossurfactantes por microrganismos pode ser realizada utilizando substratos baratos por meio de um processo fermentativo. Para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros são utilizados óleos e açúcares como uma adequada fonte de carbono (7). A estrutura do biossurfactante produzido, bem como suas propriedades emulsificantes, depende da fonte de carbono utilizada (8).

A qualidade e quantidade dos biossurfactantes produzidos são influenciadas por diversos fatores, tais como: concentrações de nutrientes como manganês, enxofre, ferro e fósforo no meio; pelas condições de cultivo como agitação, temperatura e pH; pela fonte de nitrogênio e pela fonte de carbono, sendo o último o ponto determinante da estrutura e rendimento da produção do biossurfactante (9-10).

Esses compostos podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas, seu peso molecular e o seu modo de ação (11). Os biossurfactantes de baixo peso molecular são eficazes na redução de tensões superficiais em interfaces óleo/água. Já os de alto peso molecular, também chamados de bioemulsificantes, são mais eficazes na estabilização de emulsões de óleo em água (11-12).

A utilização de matérias-primas de baixo custo e a seleção de um processo que não seja dispendioso são fatores de extrema importância para obter sucesso na produção dos biossurfactantes (13).

O interesse na utilização de resíduos agroindustriais na produção de biossurfactantes tem crescido, como alternativa para baratear os custos associados à produção desses compostos. Além disso, a aplicação desse tipo de resíduo ajuda a resolver diversos problemas ambientais (14). Essa estratégia diminui os custos da produção do biossurfactante e, conseqüentemente, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente (15).

A possibilidade de produção de surfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas permite a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, tornando-os comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (16).



Apesar de seu grande potencial, o uso de biossurfactantes em suas diversas aplicações ainda é extremamente limitado. A principal razão disso é que o custo de produção ainda é bem elevado quando comparado aos surfactantes quimicamente sintetizados. Em razão disso, ainda não há nenhum processo em larga escala comercial para a sua produção. Para que os biossurfactantes possam ter o seu uso disseminado, é necessário que os custos de sua produção sejam reduzidos de forma significativa (17).

Uma grande diversidade de microrganismos é capaz de sintetizar biossurfactantes. As leveduras, em especial a do gênero *Candida*, já foram relatadas na literatura como produtoras de tais tensoativos de origem biológica (15,18). Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*generally regarded as safe*) que muitas delas apresentam (15).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento da levedura *Candida guilliermondii* utilizando melão de cana, suco de caju e suco de abacaxi como fontes de carbono visando a produção de biossurfactante.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

O microrganismo utilizado para a produção de biossurfactante foi a levedura *Candida guilliermondii* (CCT 1516) obtida da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas/SP. A manutenção das culturas foi realizada no Meio Yeast Malt Agar (YMA), constituído de (g.L⁻¹): glicose 10; extrato de levedura 3; peptona 5; extrato de malte 3 e agar 2, a 4°C. A repicagem do microrganismo supracitado foi realizada a cada 30 dias a fim de manter a viabilidade celular

Meio utilizado na produção

O meio utilizado para a produção do biossurfactante foi proposto por Santa Anna (19), modificando apenas a fonte de carbono. A composição do meio utilizado consiste em KH₂PO₄ (3 g/L); K₂HPO₄ (7 g/L); (NH₄)₂SO₄ (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0.2 g/L) acrescido da fonte de carbono selecionada.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado transferindo três alçadas da cepa do microrganismo em um erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL do meio de cultivo proposto por Santa Anna (19),



modificando apenas na fonte de carbono. A incubação foi realizada em mesa agitadora *shaker* a 30°C e 200 rpm por 24h.

Substratos Utilizados

Para a produção biotecnológica de tensoativos foram utilizados como substratos: suco de caju em uma concentração de 30 g.L⁻¹ de açúcares redutores (AR), suco de abacaxi (20 g.L⁻¹ de AR), melão de cana (20 g.L⁻¹ de AR).

Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactantes ocorreu através de um processo de fermentação submersa, onde foram utilizados frascos erlenmeyers de 500mL, com 250 mL de meio, dos quais 10% v/v são de inóculo. O meio base utilizado para a realização dos cultivos foi proposto por Santa Anna (19), modificando apenas a fonte de carbono. O meio de cultura foi esterilizado a 1 atm e 121°C por 15 minutos e inoculado com uma concentração de células de 10% (v/v). Após isso os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora *shaker* a 30°C e agitação orbital de 200 rpm por 96h. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e sob as mesmas condições de temperatura, agitação e concentração de inóculo.

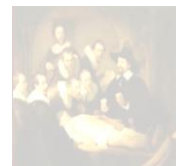
Análises realizadas

Amostras periódicas foram retiradas ao longo das 96h de cultivo a fim de se fazer uma análise da concentração de células através de medidas de absorvância e peso seco, do consumo de substrato, do pH e do índice de emulsificação.

Determinação do crescimento celular

Para a determinação do crescimento celular foi utilizado o método da turbidimetria. Para isso foram realizadas medidas da densidade óptica das amostras por meio de um espectrofotômetro na faixa do visível a um comprimento de onda de 600nm. Para a determinação da concentração celular em g.L⁻¹ foi construída uma curva de calibração que correlacionava a absorvância do meio ao peso seco da amostra.

Para a obtenção do peso seco da amostra foi retirada uma alíquota de 2mL da suspensão de células obtida ao final do cultivo, colocada em tubo ependorff previamente seco e pesado, e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi seco em estufa a 105°C por 24h. Após isso, o tubo foi resfriado em dessecador por 15 min e pesado. Esse procedimento foi realizado em triplicata. A concentração em g.L⁻¹ da amostra foi calculada conforme a Equação 1.



$$\text{Concentração} = \frac{\text{peso}_{\text{úmido}}(g) - \text{peso}_{\text{seco}}(g)}{\text{volume}(L)} \quad (1)$$

Determinação do pH

A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinado através de medidas diretas em um potenciômetro digital, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7.

Consumo de substrato

Para determinar a quantidade de açúcares redutores foi utilizado o método do 3,5-dinitrossalicilato (DNS), proposto por Miller (20), adaptado por Vasconcelos (21) da Embrapa Agroindústria Tropical.

Determinação da presença de biossurfactante

A presença de biossurfactantes foi determinada de forma indireta por meio de testes de índice de emulsificação. Para determinação do índice de emulsificação foi tomada uma alíquota de 2mL do sobrenadante livre de células obtido ao final do cultivo, transferiu-se essa amostra para um tubo de ensaio e acrescentou-se 2mL de um composto hidrofóbico. Foram testados quatro tipos diferentes, sendo eles: óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel. Os tubos foram agitados por 2 minutos em agitador do tipo vórtex e, passado esse tempo, foram deixados em repouso por 24h. O índice de emulsificação foi calculado pela razão da altura da camada emulsificada (HE em mm) e altura total (HT em mm) e multiplicada por 100, conforme a Equação 2 proposta por Wei *et al.* (22).

$$\text{IE}_{24}(\%) = \frac{HE}{HT} * 100 \quad (2)$$

Obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento

A obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento foi realizada segundo o proposto por Schmidell *et al.* (23).



4.8.1 Produtividade em biomassa

Expressa a velocidade média do crescimento microbiano, onde verifica-se a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo de cultivo. Onde, X é a concentração final de células e X_0 é a concentração inicial. O cálculo é realizado conforme a Equação 3.

$$P_x = \frac{X - X_0}{\text{tempo de cultivo}} \quad (3)$$

4.8.2 Velocidade específica de crescimento máxima

A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo na fase exponencial da curva de crescimento, onde a ação do metabolismo do microrganismo se dá de forma mais acentuada e efetiva. A velocidade corresponde à inclinação da reta obtida pelo gráfico do $\ln(X)$ versus t (tempo de cultivo), na fase mencionada. A reta é dada pela relação linear, conforme a Equação 4.

$$\ln X = \mu_{m\acute{a}x} (T - T_i) + \ln X_i \quad (4)$$

4.8.3 Tempo de Geração

O tempo de geração permite mensurar a que tempo a concentração de microrganismo irá dobrar do seu valor inicial. O mesmo é calculado pela Equação 5.

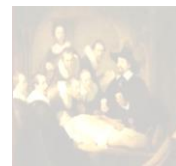
$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

4.8.4 Fator de conversão de substrato em biomassa

É a relação estabelecida entre a quantidade de biomassa produzida e o teor de substrato consumido. De modo que se verifica a influência de um sob o outro. Dado pela Equação 6, onde S_0 é a concentração final de substrato e S a inicial.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Caracterização físico-química dos substratos utilizados

Algumas características físico-químicas dos substratos utilizados no processo fermentativo estão apresentadas na Tabela 1. O potencial hidrogeniônico (pH) dos substratos utilizados apresentaram pH ácido, ficando de 3,33 e 4,21. Estes valores de pH são bons para o cultivo de leveduras, que geralmente preferem pH ácidos.

O valor de pH para o abacaxi é bem próximo aos encontrado por Nunes et al (24) e Lemos et al (25). O °Brix encontrado pelo ultimo autor foi de 9,66 enquanto que o encontrado por Nunes et al (24) foi de $11,50 \pm 0,31$. O °Brix obtido nesse trabalho foi de 14,2. Essas variações são normais que ocorrem entre as colheitas, e dependem dos fatores edáficos e climáticos a que o abacaxizeiro foi submetido.

Os valores de pH para o suco de caju foi o mesmo encontrado por Marques (26). O maior °Brix encontrado foi o do melaço de cana, sendo esse valor de 71,2. Estes valores de °Brix foram ajustados para iniciar com a mesma concentração de açúcares no meio, fazendo diluição com água destilada.

Tabela 1 – Características físico-químicas dos substratos utilizados

	Melaço de cana	Suco de abacaxi	Suco de caju
pH	3,33	3,70	4,21
°Brix	71,2	14,2	8,9

Avaliação do crescimento da levedura a partir de diferentes substratos

O microrganismo estudado foi capaz de crescer usando todos os substratos testados. Utilizando a produção de biomassa e os dados de consumo de substrato obtidos durante o bioprocessamento, as curvas de crescimento celular e a consumo de substrato foram construídas para cada cultivo (Figura 1).

As curvas com as iniciais BC representam a concentração de biomassa; as curvas com as iniciais SC representam a concentração do substrato. E os substratos testados são representados pelas seguintes iniciais: suco de abacaxi (PJ), melaço de cana (CM) e suco de caju (CAJ).

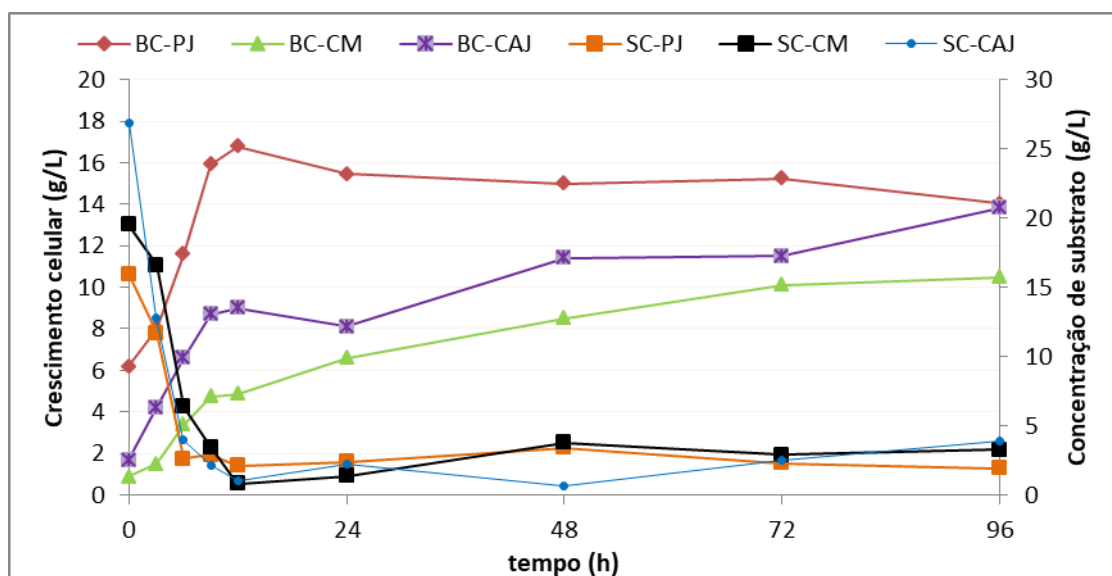
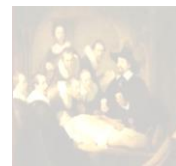


Figura 1 - Perfil cinético do crescimento celular e consumo de substrato.

O perfil cinético do crescimento mostra que a levedura testada apresentou um bom crescimento utilizando todos os substratos testados, pois houve aumento da concentração de biomassa, o que mostra que essa levedura foi capaz de assimilar todos os substratos investigados.

Utilizando o suco de caju como substrato foi obtido um crescimento celular máximo de $13,81 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas de cultivo. Nesse tempo quase todo o substrato disponível foi consumido.

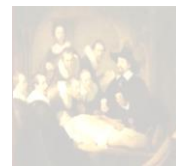
Utilizando suco de abacaxi como substrato o crescimento celular máximo foi atingido em 12 h de cultivo com uma concentração de células de $16,87 \text{ g.L}^{-1}$, depois desse tempo a concentração caiu ao longo do cultivo, e isso se deve a possível morte da levedura em decorrência da acidificação do meio, que estava 3,97 em 96 h de cultivo.

Com a utilização do melaço de cana o pico de crescimento foi de $10,47 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 h de crescimento. Em relação ao consumo de substrato é possível perceber que a quantidade fornecida foi adequada para suprir as necessidades do microrganismo, nos dois casos, uma vez que a levedura apresentou bom crescimento e consumiu quase todo o substrato fornecido.

Os parâmetros cinéticos do cultivo estão mostrados na Tabela 2

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos dos cultivos

Substrato	Px ($\text{g. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Yx/s (g/g)	μ_x (h^{-1})	Tg (h)
-----------	--	---------------	--------------------------------	-----------



Suco de caju		0,126	0,528	0,178	3,89
Suco de abacaxi		0,081	0,553	0,089	7,78
Melaço de cana		0,100	0,555	0,196	3,53

Observando-se os resultados é possível perceber que os melhores parâmetros cinéticos foram obtidos quando utilizado o suco de caju como substrato. A curva de crescimento mostra que o microrganismo teve rápida adaptação ao meio com o início da fase exponencial que foi de 0h a 9h de cultivo. A velocidade máxima específica de crescimento foi de $0,1783 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de 3,89 h. A produtividade em biomassa foi alta quando comparada com os resultados obtidos a partir de outros substratos, com um valor de $0,178 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. O rendimento de substrato em células foi de $0,528 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$.

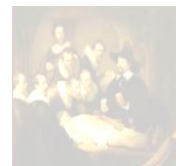
Os resultados são próximos dos encontrados por Felipe et al. (27), que estudaram o cultivo de *Candida guilliermondii* para obter bioprodutos. O meio de cultura derivou do enriquecimento de um hidrolisado hemicelulósico que tinha cerca de 32,33 g/L de Xilose, em condições de agitação e temperatura idênticas às do presente estudo, obtendo-se um coeficiente de rendimento de 0,54 g / g.

Avaliação do índice de emulsificação

Os resultados dos índices de emulsificação do caldo fermentado livre de células em 96h de cultivo utilizando a levedura *Candida guilliermondii* a partir de diferentes substratos estão apresentados na Figura 2.

O índice de emulsão é uma análise indireta da presença de biossurfactante, sua presença está relacionada a altas taxas de emulsão e estabilidade da emulsão. O melhor resultado do índice de emulsificação obtido foi de 82,68% com o óleo do motor com o suco de caju como fonte de carbono. Para o óleo de soja, o melhor resultado foi de 74,02% ao usar suco de abacaxi como fonte de carbono.

Esses resultados demonstram que, de fato, foram produzidas substâncias com capacidade para alterar as tensões interfaciais. Brasileiro et al. (28) obteve um índice de emulsão de 100% para óleo de motor com *Candida guilliermondii*, para um tempo de cultura



de 144h, com uma composição de meio diferente da utilizada neste trabalho, o que justifica as discrepâncias.

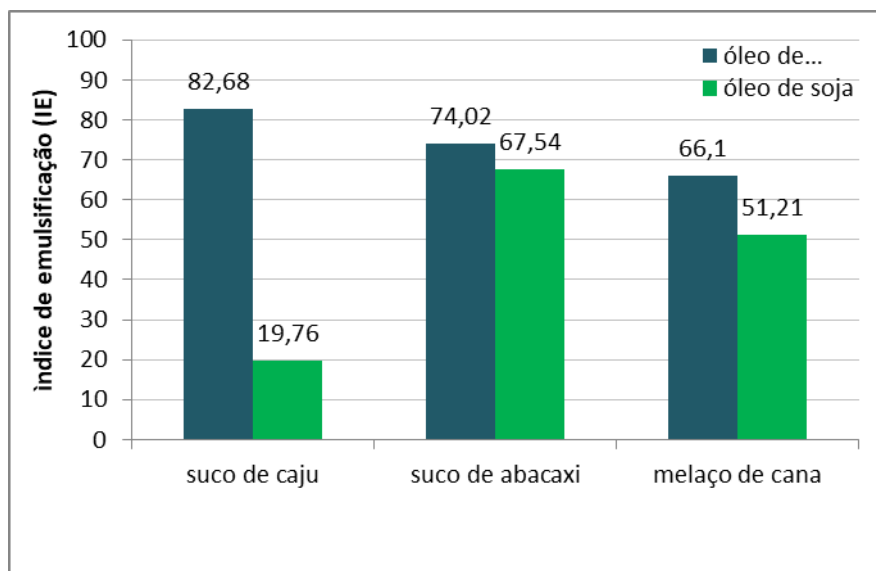


Figura 2 - Índice de emulsificação às 96h de cultivo.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível avaliar a aplicabilidade da levedura *Candida guilliermondii* em processos fermentativos visando a produção de biossurfactantes. O microrganismo estudado apresentou um bom crescimento utilizando todos os substratos testados.

Os melhores parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando suco de caju como fonte alternativa de carbono, sendo a produtividade máxima em biomassa de $0,178 \text{ g. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e um tempo de geração de 3,89h. O melhor índice de emulsificação obtido foi de 82,68 % em óleo de motor quando utilizado o suco de caju como fonte de carbono, mas o melhor substrato utilizado para a formação de emulsões foi o suco de abacaxi, pois foram obtidos altos índices de emulsificação tanto com o óleo de motor quanto com o óleo de soja, sendo eles 72,04 e 67,54%, respectivamente.

Os índices de emulsificação obtidos verificaram a presença de substâncias tensoativas, mostrando que o bioprocessamento estudado e desenvolvido cumpre o que foi proposto. Os biossurfactantes produzidos poderiam ser aplicados em biorremediação de águas e solos, além de serem aplicados na indústria alimentícia como bioemulsificantes.

REFERÊNCIAS

- SANTOS SFM et al. Avaliação da Produção de Biossurfactante a Partir de Diferentes Fontes de Carbono por *Candida Guilliermondii*.
Revista Saúde e Ciência online, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p.



1. Nitschke M, Pastore G M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova*, v. 25. 2002. p. 772-776,.
2. Araújo L V, Freire, D M G, Nitschck M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 6, 848-858, 2013.
3. KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE. S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnology Applied Biochemistry*, n. 31, p. 249-253, 2000.
4. Desai, J.D.; Banat, I.M. Microbial production of surfactantes and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
5. Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf.* 152: 41-52, 1999.
6. Cerqueira, Vanessa Sacramento; Costa, Jorge Alberto Vieira. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e Biológico. *Quim. Nova*, v. 32, n. 2, p. 394-400, 2009.
7. Bueno, Silvia Messias; Da Silva, Adriana Navarro; Garcia-Cruz, Crispin Humberto. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Quim. Nova*, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.
8. Fontes, G. C.; Amaral, P. F. F; Coelho, M. A. Z. Produção de biossurfactante por leveduras. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.
9. Banat, I.M. Biossurfactantes production and possible uses in microbial enhanced oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, Essex, v.51, p. 1-12, 1995.
10. Faria, A. F. Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual. Tese de Doutorado Universidade Estadual de Campinas, 2010.
11. BANAT, Ibrahim M. Et Al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
12. Rosenberg, E.; Ron, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.
13. Bueno, S. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, SP, 2008.
14. Govindammal, M.; Parthasarathi, R. Biosurfactant production using pineapple juice as medium by *Pseudomonas fluorescens* isolated from mangrove forest soil. *Ind. Streams Res. J*, v. 2, p. 1-10, 2013.
15. Fontes, G. C.; Amaral, P. F. F; Coelho, M. A. Z. Produção de biossurfactante por leveduras. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.
16. Felix, Anne Kamilly Nogueira. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Ceará, 2012.
17. Krieger, N.; Camilios Neto, D.; Mitchell, D.A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: Ramkrishna Sen. (Org.). *Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants*. New York: Springer Science+Business media, LCC< Landes Bioscience, v.672, p.203-209, 2010.
18. Luna, J. M., Rufino, R. D., Jara, A. M. A., Brasileiro, P. P., Sarubbo, L. A., 2015. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 413-418.



19. Santa Anna, L. M, G. V. Sebastian, N. Pereira, Jr., T. L. M. Alves, E. P. Menezes, D. M. G. Freire. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 91, n. 1-9, p. 459-467, 2001.
20. Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar *Analytical Chemistry* 1959 31 (3), 426-428 ,1959.
21. Vasconcelos, N.M. D. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.
22. Wei, Y.; Chou, C.; Chang, J. *Rhamnolipid production by indigenous Pseudomonas aeruginosa originating from petrochemical wastewater*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p. 146-154, 2005.
23. Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.2, 2001
24. NUNES, RAIMUNDO PONTES Et Al. Características físicas, físico-químicas, químicas e atividade enzimática de abacaxi cv. Smooth cayenne recém colhido *Chemical, physical, physicochemical and enzymatic activity attributes of recently harvested pineapple cv. Smooth Cayenne*. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 21, n. 2, p. 273-282, 2010.
25. Lemos, D. M. et al. Composição físico-química de resíduos de abacaxi in natura e desidratado. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 4, n. 2, p. 53-56, 2010.
26. Marques, L. F., *Processamento do pedúnculo do caju em avançado estágio de maturação: Desidratação osmótica e secagem para elaboração de passas de caju*. *Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola*. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB, 2006.
27. Felipe, M. G. A., Haully, M. C. O., Canettieri, E. V., Candido, E. J., Tamanini, C., 2003. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xylitol por processo fermentativo. XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 5-8.
28. BRASILEIRO, P. P. F. et al. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido em biorreator para biorremediação. In: I Congresso Internacional de Ciências Biológicas, II Congresso Nacional de Ciências Biológicas e VI Simpósio de Ciências Biológicas. 2013