

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Glicolípidos: da Biossíntese à Terapêutica

Ana Carolina Teixeira de Melo

Monografia orientada pela Professora Doutora **Maria Henriques Ribeiro**,
Professora Associada

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2022

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Glicolípidos: Da Biossíntese à Terapêutica

Ana Carolina Teixeira de Melo

Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Monografia orientado(a) pela Professora Doutora **Maria Henriques
Ribeiro**, Professora Associada

2022

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro, por me ter apoiado sempre ao longo destes anos enquanto aluna da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Agradecer sempre o carinho especial que demonstrou e pela confiança que me concedeu ao estar lá sempre que precisei, para me dar esperança de que iria conseguir alcançar os meus objetivos.

Um outro agradecimento à minha família por me ter apoiado sempre apesar das dificuldades. Ao meu pai, por sempre ter suportado os meus estudos e dado tudo o que precisei. À minha avó, que sempre teve um orgulho imenso na primeira neta, mas que, infelizmente, partiu antes de a ver de bata branca como doutora. À minha mãe e minha irmã mais nova que vivem comigo, por me aturarem e estarem sempre lá ao longo do caminho; é a elas que dedico a presente monografia.

RESUMO

Os **biossurfactantes** são compostos tensoativos de origem microbiana, capazes de reduzir a tensão superficial nas interfaces entre líquidos, sólidos e gases, permitindo assim que prontamente se misturem ou se dispersem enquanto emulsões em água ou outros líquidos. A enorme procura do mercado por tensoativos é, na maior parte das vezes, atendida por tensoativos químicos sintéticos, principalmente à base de petróleo. Estes compostos são geralmente tóxicos para o meio ambiente e não biodegradáveis. A restrição das regulamentações ambientais e o aumento da consciencialização sobre a necessidade de proteger os ecossistemas levaram efetivamente a um maior interesse nos biossurfactantes como possíveis alternativas aos químicos. A grande maioria dos surfactantes usados comercialmente ganhou importância dadas as suas consideráveis propriedades como baixa toxicidade, natureza biodegradável, potencial eficácia a temperaturas ou pH extremos e diversidade. A sua gama de aplicações inclui a indústria do petróleo e a biorremediação ambiental, bem como a indústria alimentar e as indústrias farmacêutica e cosmética. Mas durante a última década, a utilização e potenciais aplicações comerciais dos biossurfactantes aumentou consideravelmente no setor da saúde. As suas atividades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral tornaram-nos relevantes no combate a diversas doenças, atuando como agentes terapêuticos. Além disso, enquanto agentes antiadesivos são úteis para o revestimento adequado de materiais de inserção médica, levando a uma redução no grande número de infeções hospitalares sem recorrer a fármacos e químicos sintéticos.

Os glicolípidos são o tipo de biossurfactantes mais afamado de entre os compostos tensoativos, podendo ser classificados como glicolípidos simples ou compostos. Salvo poucas exceções, as etapas biossintéticas exatas da maioria dos glicolípidos simples ainda não são totalmente compreendidas. No entanto, de forma geral, implicam o fornecimento e a ligação de precursores glicosil e lipídicos, ligação essa que é principalmente via ligações O-glicosídicas ou éster, formadas por glicosiltransferases ou aciltransferases, respetivamente.

Na presente monografia são apresentadas de forma clarificada o conceito e possíveis aplicações dos biossurfactantes, acompanhando o seu percurso desde a biossíntese até à terapêutica.

Palavras-chave: Biossurfactantes; Tensioativos; Glicolípidos; Biossíntese; Aplicações terapêuticas.

ABSTRACT

Biosurfactants are surface-active compounds of microbial origin, capable of reducing surface tension at the interfaces between liquids, solids and gases, thus allowing them to readily mix or disperse as emulsions in water or other liquids. The huge market demand for surfactants is mostly met by synthetic chemical surfactants, mainly petroleum-based. These compounds are generally toxic to the environment and non-biodegradable. Tightening environmental regulations and increasing awareness of the need to protect ecosystems have effectively led to increased interest in biosurfactants as possible alternatives to chemical surfactants. The vast majority of commercially used surfactants have gained importance given their considerable properties such as low toxicity, biodegradable nature, potential effectiveness at extreme temperatures or pH and diversity. Its range of applications includes the petroleum industry and environmental bioremediation, as well as the food industry and the pharmaceutical and cosmetic industries. But during the last decade, the use and potential commercial applications of biosurfactants has increased considerably in the healthcare sector. Their antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral activities have made them relevant in the fight against various diseases, acting as therapeutic agents. Furthermore, while anti-adhesive agents, they are useful for the proper coating of medical insert materials, leading to a reduction in the large number of nosocomial infections without resorting to synthetic drugs and chemicals.

Glycolipids are the most famous type of biosurfactants among surfactant compounds, and can be classified as simple or compound glycolipids. With few exceptions, the exact biosynthetic steps of most simple glycolipids are still not fully understood. However, in general, they involve the supply and binding of glycosyl and lipid precursors, which bonding is mainly via O-glycosidic or ester bonds, formed by glycosyl transferases or acyl transferases, respectively.

In this monograph, the concept and possible applications of biosurfactants are presented in a clarified way, following their path from biosynthesis to therapy.

Keywords: Biosurfactants; Surfactants; Glycolipids; Synthesis; Therapeutic applications.

ABREVIATURAS

ACP - Proteína Transportadora de Acilo
(*Acyl Carrier Protein*)

ACs – Aciltransferases

AlSi – Alumínio-Silício

ATCC – *American Type Culture Collection* (centro global de recursos biológicos)

ATP - Adenosina trifosfato/ trifosfato de adenosina

cAMP- Adenosina-monofosfato cíclico

CE - Carbohidrato Esterases

CFTR - Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)

CGLs – Glicolípidos Complexos

CMC – Concentração Micelar Crítica

CoA – Coenzima A

DG – Doença de Gaucher

G-CSF – Fator estimulador de colónias de granulócitos

GH – Glicosido Hidrolases

GLs – Glicolípidos

GM-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos

HIgG – Imunoglobulina G humana

IAF - *Instituto Armand Frappier*

IgE – Imunoglobulina E

IMET – *Media de Informação e Tecnologia Educacional (Information Media and Educational Technology)*

LE – Lípido Esterases

MEL – Lípidos de Manosileritritol

MEOR - *Recuperação Microbiana Melhorada de Petróleo*

NB-DGJ - análogo de galactose da N-butildesoxinojirimicina

NB-DNJ - análogo de glicose da N-butildesoxinojirimicina

NGF – Fator de Necrose Tumoral

OOME - Efluente de moinho de azeite (*Olive Oil Mill Effluent*)

PHEMA - poli(2-hidroxietil) metacrilato

PLA2 - Fosfolipase A2

RLs – Ramnolípidos

SACs – Componentes tensioativos surfactantes (*Surface Active Compounds/Components*)

SGLs – Glicolípidos Simples

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

TLs – Lípidos de Trealose

TOM - Transplantes de medula óssea

UCP - Universidade Católica de Pernambuco (*Catholic University of Pernambuco*)

UG – Universidade de Guelph (*University of Guelph*)

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE	7
BIOSSURFACTANTES	9
1. Introdução	9
2. Objetivos	10
3. Materiais e Métodos	10
4. Resultados e Discussão	11
4.1 Glicolípidos	12
4.2. Síntese Metabólica	15
4.3. Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes	19
4.4 Matérias-primas para a produção de biossurfactantes	21
4.5. Cinética de fermentação.....	23
4.6. Aplicações dos glicolípidos	25
4.6.1. Indústria Petrolífera.....	25
4.6.2. Biorremediação.....	29
4.6.3. Indústria Alimentar	30
4.6.4. Agricultura.....	32
4.6.5. Mineração.....	33
4.6.6. Cosméticos.....	33
4.6.7. Aplicações terapêuticas	33
4.6.7.1. Atividades biomédicas e terapêuticas dos biossurfactantes	34
4.6.7.2. Atividade antiadesiva dos glicolípidos	37
4.7. Patologias associadas a glicolípidos e Ensaios Clínicos.....	39
5. Conclusão	41
6. Referências Bibliográficas	43
8. Anexos	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura orgânica de um tensoativo	9
Figura 2 - Classificação dos glicolípidos e principais tipos de ligações entre os resíduos glicosil e lipídico.....	13
Figura 3 - Estrutura dos biossurfactantes glicolipídicos	15
Figura 4 - Metabolismo relacionado com a síntese de precursores de biossurfactantes usando carboidratos como substrato	16
Figura 5 – Metabolismo relacionado com a síntese de precursores de biossurfactantes usando hidrocarbonetos como substrato	17
Figura 6 - Enzimas-chave da biossíntese e hidrólise de glicolípidos	18
Figura 7 - Enzimas-chave da biossíntese e hidrólise de glicolípidos	19
Figura 8 - Ilustração esquemática com os diferentes tipos de cinética de fermentação para produção de biossurfactantes	24
Figura 9 - Estruturas dos açúcares imino: NB-DNJ => análogo de glicose, NB-DGJ => análogo de galactose	40
Figura 10 - Resumo da biossíntese de glicosíngolipídios destacando a biossíntese de GlcCer catalisada pela glicosiltransferase, que é a etapa da via sintética inibida por NB-DNJ e NB-DGJ	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microorganismos produtores	11
Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	25
Tabela 3 - Aplicações comuns dos biossurfactantes na indústria do petróleo	26
Tabela 4 - Aplicações terapêuticas dos biossurfactantes	34

BIOSURFACTANTES

1. Introdução

Os **tensioativos**, por vezes também chamados de “**surfactantes**” (*surface active compounds* - SAC) são moléculas anfipáticas constituídas por grupos hidrofílicos (ou iónicos) (1) (comumente referidos como "cabeças polares") e grupos hidrofóbicos (“caudas apolares”, geralmente hidrocarbonetos) (2)(3) - figura 1. Estas regiões conferem às moléculas a capacidade de se acumular entre fases fluidas, como óleo/água ou ar/água, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais e formando micelas/emulsões (3), onde os hidrocarbonetos se podem solubilizar em água ou onde a água se pode solubilizar nos hidrocarbonetos (2).

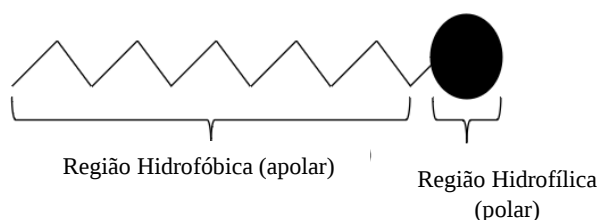


Figura 1 - Representação da estrutura orgânica de um tensoativo (1)

Estas propriedades conferem a estes compostos excelentes características de detergência, emulsificação, formação de espuma e dispersão, o que os torna um dos produtos mais versáteis da indústria química. São utilizados em todas as áreas industriais, desde detergentes domésticos a produtos alimentares e farmacêuticos (4).

Os surfactantes podem ser sintetizados por via **química** a partir de derivados do petróleo ou por via **biotecnológica** utilizando microorganismos e matéria-prima renovável (5). Mas, de facto, a grande maioria dos SACs atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo (2). Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, em conjunto com novas legislações de controlo ambiental, levaram à procura de surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (6).

Assim, são os surfactantes microbianos que têm despertado um interesse crescente nos últimos anos devido à sua diversidade, natureza *environmentally friendly*¹, possibilidade de produção por fermentação e potenciais aplicações no campo da biorremediação, bem como nas indústrias de petróleo, química, agrícola, alimentar, biomédica e outras (7).

Estes apresentam, assim, diversas vantagens sobre os tensoativos químicos, nomeadamente: uma menor toxicidade, maior biodegradabilidade (8), maior biocompatibilidade e digestibilidade (9), melhor compatibilidade ambiental, maior formação de espuma (10), alta seletividade e atividade específica em condições extremas de temperaturas, pH e salinidade (11), para além da possibilidade de serem produzidos a partir de

¹ “Amigos do Ambiente”

recursos económicos e renováveis, como óleos vegetais, resíduos de destilaria e resíduos de laticínios (12).

Os microorganismos são capazes de sintetizar uma ampla gama de SACs estruturalmente diversos (13). Não obstante, todos são constituídos por uma região **hidrofílica** (um éster, um hidroxilo, um grupo fosfato, um grupo carboxilato ou um açúcar) (9) e uma região **hidrofóbica**/ lipofílica (cadeias de hidrocarbonetos de um ou mais ácidos gordos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados) (6). Essas estruturas conferem uma ampla gama de propriedades, incluindo a capacidade de diminuição da tensão superficial e interfacial de líquidos e a formação de micelas e microemulsões entre duas fases diferentes (7).

2. Objetivos

A presente monografia pretende apresentar de forma clarificada o conceito de “biossurfactantes”, mais concretamente dos glicolípidos, incluindo a sua síntese metabólica, os fatores que influenciam a sua produção, as diferentes matérias-primas utilizadas, as possibilidades de cinéticas de fermentação e, em especial, as suas aplicações, nomeadamente na área da saúde. Por consequência, em última instância, pretende-se uma reflexão sobre o presente e o futuro no que concerne à possibilidade de realização de ensaios clínicos envolvendo este tipo de compostos.

3. Materiais e Métodos

A presente monografia foi elaborada com base em vários artigos científicos disponibilizados *online*, nomeadamente através dos motores de busca *PubMed*, *Elsevier* e *GoogleScholar*, alguns de acesso gratuito outros não. Para a pesquisa foram utilizados vários termos-chave, destacando-se: *biossurfactantes*, *tensioativos*, *glicolípidos*, *síntese*, *fatores de produção*, *cinética de fermentação*, *matérias-primas*, *aplicações dos biossurfactantes*, *aplicações terapêuticas*, *ensaios clínicos*, *Doença de Gaucher*, *N-butildesoxinojirimicina* e *saúde*. Os artigos foram sujeitos a cuidadosa análise e síntese, com o objetivo de redigir um texto claro, coerente e coeso sobre o tema.

Os critérios de inclusão passaram por diversos artigos sobre classificação, estrutura, biossíntese, produção e aplicações de biossurfactantes, mais concretamente glicolípidos e patologias associadas a este tipo de compostos. Foram, portanto, excluídos os artigos encontrados acerca de biossurfactantes de outros tipos, nomeadamente lipoproteínas, ácidos gordos, lípidos neutros, fosfolípidos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. Foram também excluídos estudos clínicos realizados em animais ou células, mas também ensaios clínicos (em humanos) sobre a fisiopatologia de outras doenças associadas a biossurfactantes que não a Doença de Gaucher ou sobre outras enzimas que não a glucosiltransferase específica da ceramida (GlcT-1). Como consequência, dos 142 artigos consultados, apenas 93 foram, de facto, utilizados para a redação da presente monografia.

A pesquisa de artigos científicos foi efetuada entre fevereiro de 2021 e junho de 2022. A seleção baseou-se na sua credibilidade científica, relevância para o tema em questão e data de publicação, tendo sido utilizada uma janela temporal bastante vasta, desde 1970 até 2021.

4. Resultados e Discussão

Os microorganismos são capazes de sintetizar uma ampla gama de compostos surfactantes estruturalmente diversos (13). Estes podem ser divididos essencialmente em duas classes principais (13):

-Compostos de baixo peso molecular – “**biossurfactantes**”(13) – são geralmente glicolípidos (como, por exemplo, lípidos de trealose, soforolípidos e ramnolípidos), ou lipopéptidos (como surfactina, gramicidina S e polimixina) ou fosfolípidos. São mais eficazes a diminuir as tensões superficiais e interfaciais (14).

-Compostos de alto peso molecular – “**bioemulsificantes**” – polímeros anfifílicos e polifílicos (7), como por exemplo polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas destes biopolímeros. Incluem, portanto, surfactantes poliméricos e particulados (12). Estes são mais eficazes na estabilização de emulsões de óleo em água (14).

Na **tabela 1** são apresentados vários tipos de biossurfactantes e os microorganismos envolvidos.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microorganismos produtores (2)

Tipo de biossurfactante	Subtipo de biossurfactante	Microorganismo produtor
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> , <i>T. petrophilum</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Wickerhamiella domericqiae</i>
	Lípidos de trealose/ Trealolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Micrococcus luteus</i>
	Lípidos de celebiose	<i>Ustilago zeae</i> , <i>U. maydis</i>
Lipopéptidos e Lipoproteínas	Péptido-lípido	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Ornitina (15)	<i>Pseudomonas sp</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidinas	<i>Bacillus brevis</i>
Ácidos gordos, lípidos neutros e fosfolípidos	Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Ácidos gordos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Lípidos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i> <i>Clostridium sp</i> (15)
	Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>

Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Alasan (15)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	Liposan	<i>Candida tropicalis</i> (15)
	Carbohidrato-lípido-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Manana-lípido-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
	Ácidos corinemicólicos (15)	<i>Corynebacterium</i> sp
Surfactantes particulados	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Células	Várias bactérias

4.1 Glicolípidos

Como já referido anteriormente, os biossurfactantes mais conhecidos são os **glicolípidos** (GLs), dos quais os mais eficazes do ponto de vista das propriedades tensoativas são os lípidos de trealose (**treololípidos**) obtidos de *Mycobacterium* e bactérias relacionadas, os **ramnolípidos** obtidos de espécies de *Pseudomonas*, e os **soforolípidos** obtidos de leveduras (16).

Os glicolípidos podem ser classificados como glicolípidos **glicosídicos** e glicolípidos **não glicosídicos**, nos quais os resíduos de açúcar e os resíduos lipídicos estão ligados por meio de ligações glicosídicas (por exemplo, ligações O- ou N-glicosídicas) e não glicosídicas (por exemplo, ligações éster ou amida), respetivamente (figura 2B).

Os resíduos glicosil podem ser mono-, di-, oligo- ou polissacarídeos (por exemplo, glicose, celobiose ou glicano, respetivamente), açúcares de álcoois ou poliois (como manitol, eritritol ou arabinol), amino-açúcares (como desosamina) ou ácidos de açúcares (como os ácidos glucorónicos). Já o resíduo lipídico pode variar: ácidos gordos, policetídeos, esteróis, hopanoides e carotenoides com diferentes substituições, comprimentos de cadeia, níveis de saturação, ramificação e polimerização (17).

Outra forma de classificação destes compostos é como glicolípidos **simples** e **complexos** (figura 2A).

Os glicolípidos **simples** (SGLs), por vezes chamados de **sacarolípidos**, são constituídos apenas por dois componentes (glicosil e lipídico), sendo que as regiões glicosil e lipídica estão diretamente ligadas entre si. Incluem, portanto ácidos e álcoois gordos glicosilados, carotenoides, hopanoides e esteróis glicosilados (17), mas também glicolípidos contendo oligossacarídeos (17).

Os glicolípidos **complexos** (CGLs) são, no entanto, estruturalmente mais heterogéneos, pois contêm, para além das frações glicosil e lipídica, outros resíduos como glicerol (glicoglicerolípidos), péptidos (glicopeptidolípidos), esfingosina acilada (**glicoesfingolípidos**, por exemplo **glucosilceramida**) ou outros resíduos (17).

Os GLs contendo polissacarídeos, embora não contenham nenhum resíduo para além das frações glicosil e lipídica, são classificados em glicolípidos **complexos** devido à natureza complexa dos resíduos polissacarídicos (17).

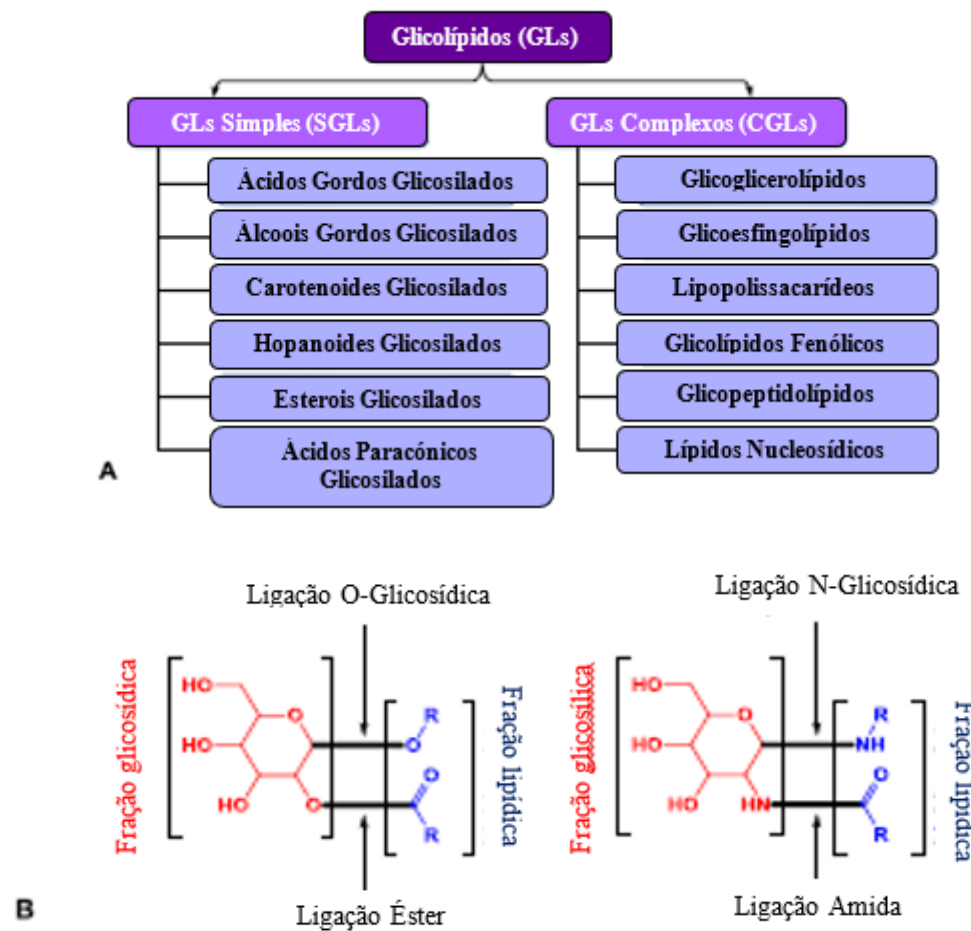


Figura 2 - Classificação dos glicolípidos e principais tipos de ligações entre os resíduos glicosil e lipídico (17)

Alguns dos mais conhecidos glicolípidos **simples** são os ramnolípidos, os trealolípidos (SGLs bacterianos), e os soforolípidos (SGLs fúngicos) (2)(17).

1. Ramnolípidos - São os glicolípidos mais bem estudados, nos quais uma ou duas moléculas de ramnose estão ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico. São produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (18).

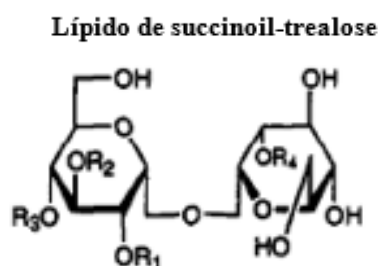
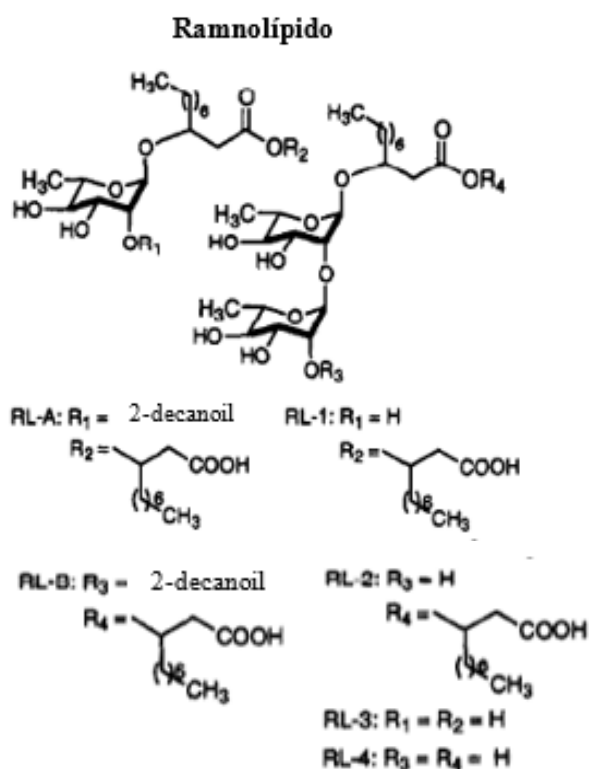
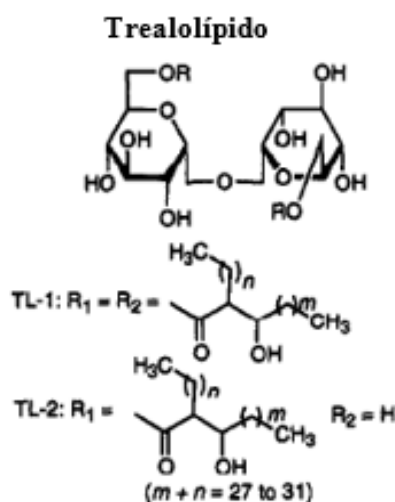
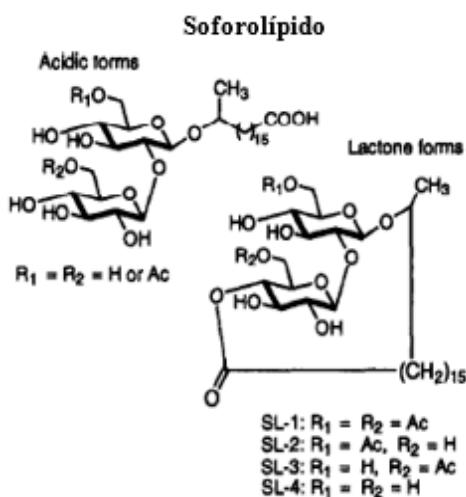
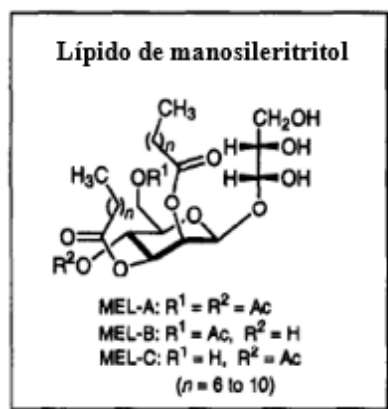
2. Trealolípidos – são glicolípidos formados por associação do dissacarídeo trealose aos ácidos micólicos, na maioria das espécies de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium*. Os ácidos micólicos são ácidos gordos de cadeia longa hidroxilados em configuração α ou β .

Consoante os diferentes organismos produtores, diferem no tamanho e estrutura do ácido micólico, no número de átomos de carbono e no grau de insaturação. Um exemplo é o dimicolato de trealose produzido por *Rhodococcus erythropolis* (19).

A maioria dos lípidos de trealose sintetizados por *Rhodococcus* e géneros relacionados estão ligados ao invólucro celular e são produzidos principalmente quando os microrganismos são cultivados em hidrocarbonetos, o que acarreta consequências negativas ao nível da sua produção e recuperação para aplicações industriais (20).

3. Soforolípidos - consistem num carbohidrato dimérico de sofrose ligado a um ácido gordo hidroxilado de cadeia longa. São produzidos principalmente por leveduras como *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum* e *T. apicola*. Embora possam diminuir a tensão superficial e interfacial, não são agentes emulsificantes eficazes (21).

A **Figura 3** ilustra a estrutura dos biossurfactantes glicolipídicos (22).



STL-1: $R_1 - R_4 = 2 \times \text{succinil} + 2 \times \text{hexadecanoil}$
STL-2: $R_1 - R_3 = 1 \times \text{succinil} + 2 \times \text{hexadecanoil}$
 $R_4 = \text{H}$
Trehalose-tetraester: $R_1 = \text{succinil}$
 $R_2 = R_3 = R_4 = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$
($n = 6$ to 12)

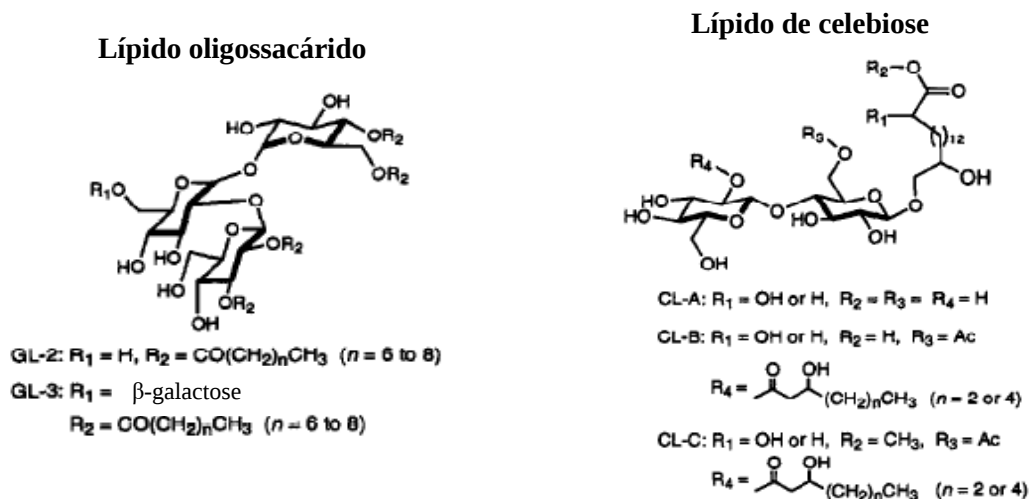


Figura 3 - Estrutura dos biossurfactantes glicolipídicos (adaptado, 24)

Os vários surfactantes microbianos podem ser distinguidos de acordo com outros critérios, como por exemplo, a sua natureza bioquímica (ácidos gordos, lípidos, bacteriocinas, péptidos, polissacarídeos), a natureza da parte hidrofílica (grupo carboxilato nos ácidos gordos, glicerol nos glicerolípidos, carboidratos nos glicolípidos, etc.), a espécie dos organismos produtores, mas também de acordo com o tipo de fonte de carbono utilizada para a sua produção (por exemplo hidrocarbonetos, carboidratos, gorduras e óleos) (13).

4.2. Síntese Metabólica

O principal papel fisiológico dos biossurfactantes é permitir que os microrganismos cresçam em substratos insolúveis em água através da redução da tensão superficial entre fases, tornando, assim, o substrato mais disponível para absorção e metabolismo (23).

Os microorganismos utilizam os substratos hidrofílicos principalmente para o metabolismo celular e para a síntese da fração polar dos biossurfactantes, enquanto os substratos hidrofóbicos são usados exclusivamente para a produção da fração de hidrocarboneto dos biossurfactantes (2,23).

Diversas vias metabólicas estão envolvidas na síntese de precursores para a produção de biossurfactantes e dependem da natureza das principais fontes de carbono empregues no meio de cultura. Por exemplo, quando os carboidratos (formados por C^2 , H^3 e O^4), são a única fonte de carbono para a produção de um glicolípido, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogénica (para formação de lípidos) e de formação da região hidrofílica (através da via glicolítica) são supridas pelo metabolismo do agente microbiano, conforme ilustrado na figura 4 (23,24).

Um substrato hidrofílico, como a glicose ou o glicerol, é degradado até originar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato, que é um dos principais precursores de carboidratos encontrados na fração hidrofílica de um biossurfactante. Para a

² Carbono

³ Hidrogénio

⁴ Oxigénio

produção de lípidos, a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise e o piruvato é convertido em acetil-CoA, que produz malonil-CoA quando unido ao oxaloacetato, seguido pela conversão em ácido gordo, que é um dos precursores da síntese dos lípidos (23) (figura 4).

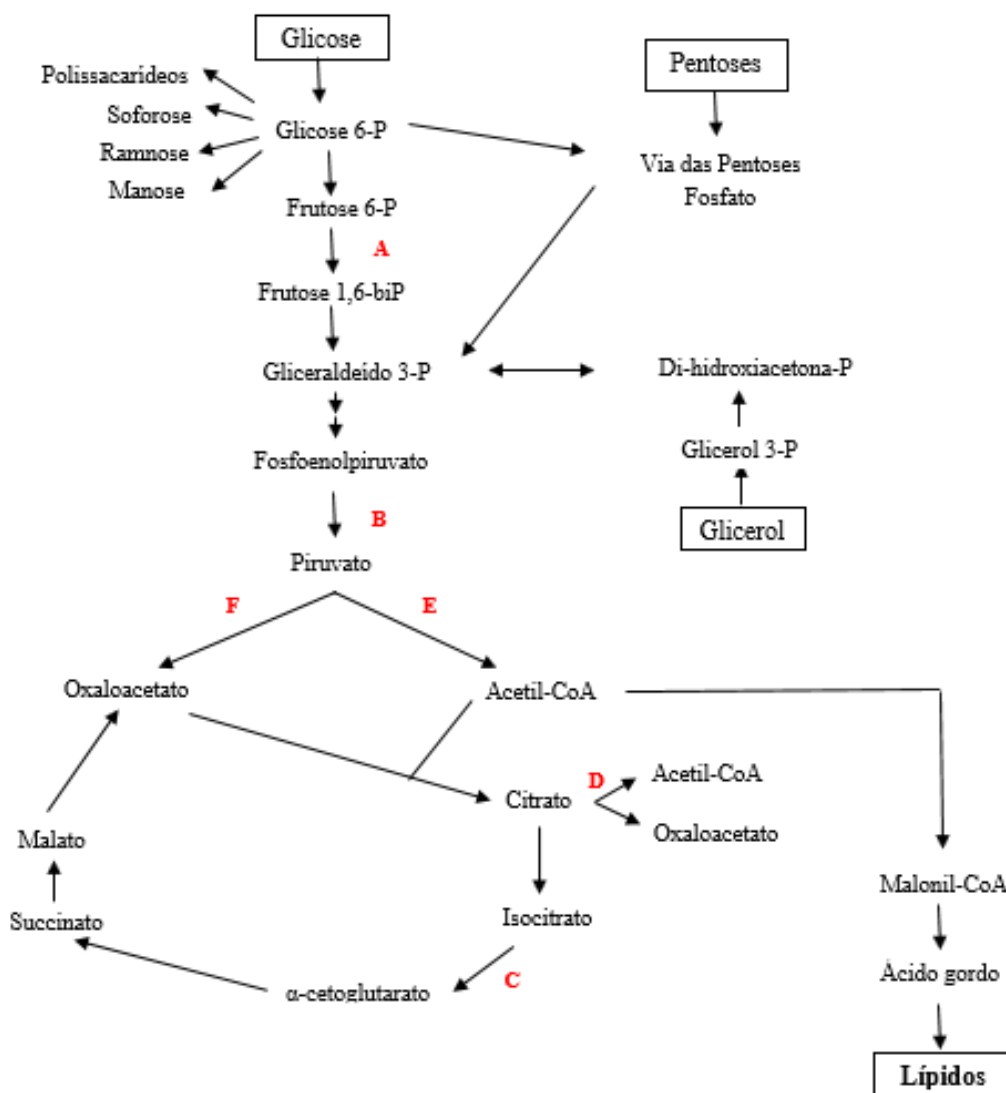


Figura 4 - Metabolismo relacionado com a síntese de precursores de biosurfactantes usando carboidratos como substrato

A – fosfofrutocinase, B – piruvato cinase, C – isocitrato desidrogenase, D - citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos), E - piruvato desidrogenase; F - piruvato carboxilase (adaptado 25,26)

No entanto, quando é usado um hidrocarboneto (formado apenas por C e H) como fonte de carbono, o mecanismo microbiano é direcionado principalmente para a via lipolítica e para a gliconeogénese, permitindo assim o seu uso para a produção de ácidos gordos ou açúcares. Para a produção de açúcares, a via da gliconeogénese é ativada. Esta consiste na oxidação de ácidos gordos por meio da β-oxidação em acetil-CoA (ou propionil-CoA no caso de ácidos gordos de cadeia ímpar). A partir da formação de acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese de precursores de polissacarídeos, como a glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso das

envolvidas na glicólise. No entanto, as reações catalisadas pela piruvato cinase (figura 4, B) e pela fosfofrutocinase-1 (figura 4, A) são irreversíveis. Por isso, são necessárias outras enzimas exclusivas do processo de gluconeogênese para evitar tais reações. As principais reações são apresentadas na figura 5, até a formação da glicose 6-fosfato, que é a principal precursora dos polissacarídeos, formados para a produção da fração hidrofílica dos glicolípidos (23,24).

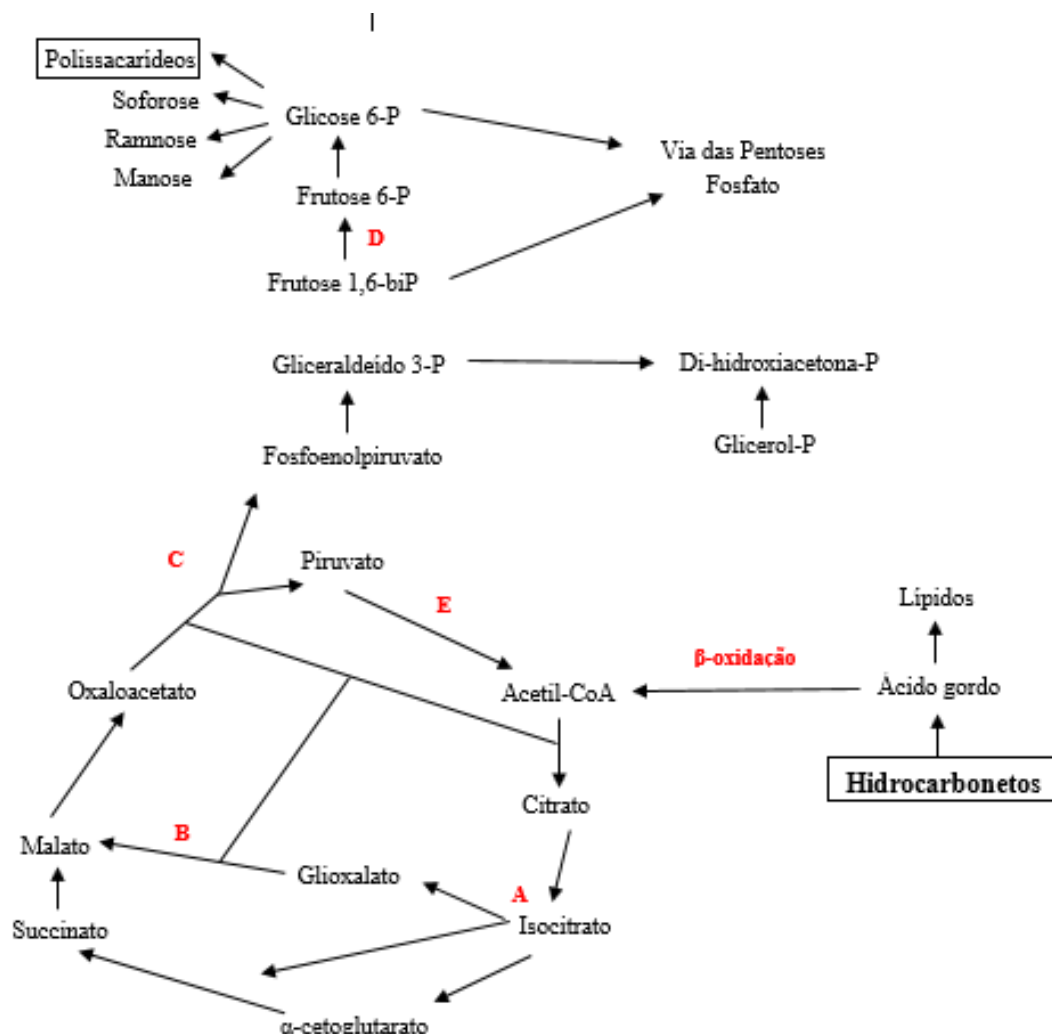


Figura 5 – Metabolismo relacionado com a síntese de precursores de biosurfactantes usando hidrocarbonetos como substrato

A – isocitrato liase, B – malato sintase, C – fosfoenolpiruvato carboxilase, D - frutose-1,6 bifosfatase (adaptado 25,26)

Depois, a síntese dos biosurfactantes propriamente ditos depende da polaridade da fonte de carbono, que afeta a especificidade das rotas biossintéticas em cada organismo.

Existem várias possibilidades para a síntese das diferentes frações de biosurfactantes e sua ligação, particularmente nos glicolípidos (2,25):

1. as frações hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas independentemente do substrato (“de novo”) por duas vias independentes
2. a região hidrofílica é sintetizada de novo enquanto a síntese da região hidrofóbica é induzida pelo substrato
3. a região hidrofóbica é sintetizada de novo, enquanto a síntese da região hidrofílica é dependente do substrato
4. a síntese de ambas as regiões hidrofóbica e hidrofílica é dependente do substrato (2,25).

Apesar disso, salvo poucas exceções, as etapas biossintéticas exatas da maioria dos glicolípidos simples (SGLs) ainda não são totalmente compreendidas. No entanto, de forma geral, implicam sempre o fornecimento e a ligação dos precursores glicosil e lipídicos, ligação essa que é principalmente via ligações O-glicosídicas ou éster, formadas por glicosiltransferases (GT – figura A1) ou aciltransferases (AT – figura A2) respectivamente (17).

As glicosiltransferases catalisam a transferência da fração açúcar de um doador de glicosil ativado (geralmente um açúcar-nucleótido ou um fosfato) para um aceitador de lipídios, formando ligações glicosídicas entre os grupos hidroxilo (nucleófilos) do aceitador e o carbono anomérico do doador (17).

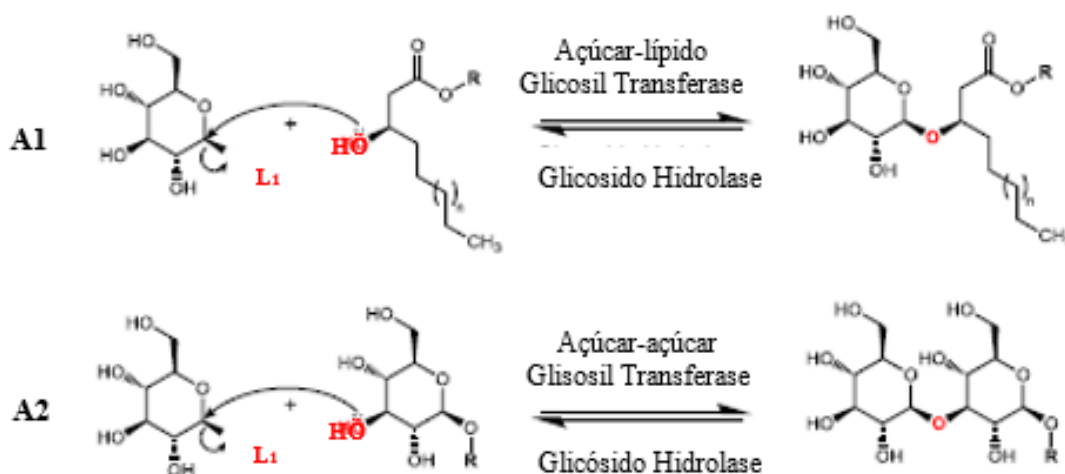


Figura 6 - Enzimas-chave da biossíntese e hidrólise de glicolípidos

L1: Grupos ativadores de nucleótidos ou fosfatos em doadores de grupos glicosil (17).

As aciltransferases (AT), por sua vez, catalisam a transferência da fração lipídica de um doador de acil ativado (principalmente acil-CoA ou acil-ACP), para um aceitador de glicosil, formando uma ligação éster entre o grupo hidroxila (nucleófilo) do aceitador e o grupo carbonila do doador (17).

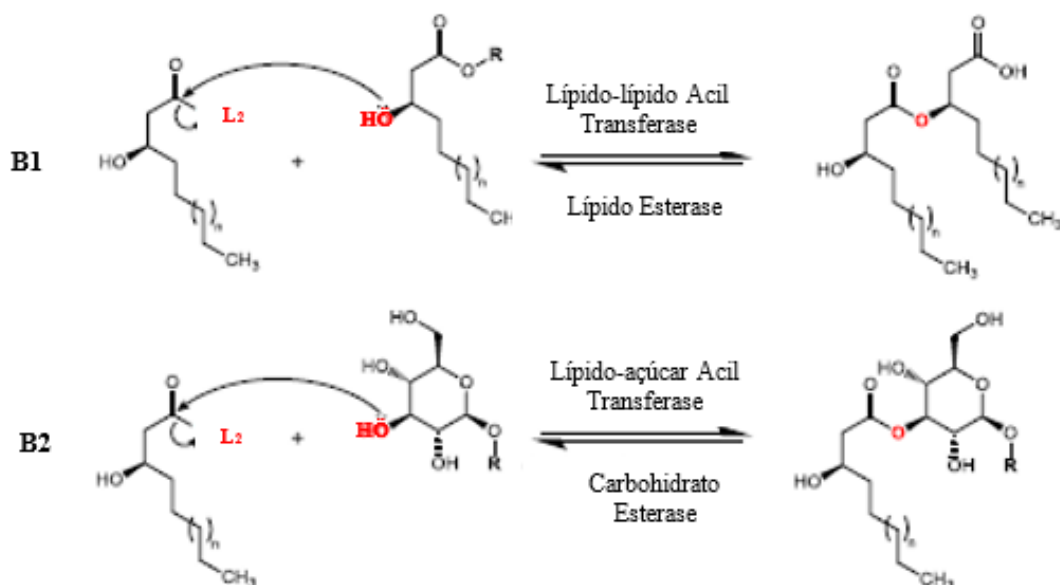


Figura 7 - Enzimas-chave da biossíntese e hidrólise de glicolípidos

L2: Coenzyme A (CoA-S-) or Acyl Carrier Protein (ACP-S-) activating groups on acyl donors;
 L2: Grupos ativadores da Coenzima A (CoA-S-) ou da Proteína transportadora/ carrier .de Acilo (ACP-S-) em dadores de grupos acilo (17)

4.3. Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes

Diferentes fatores, como a fonte de carbono, a fonte de nitrogénio ou as condições ambientais podem influenciar a produção de biossurfactantes.

1. Fonte de carbono

Evidências comprovadas levaram à conclusão de que a fonte de carbono disponível, particularmente o carbohidrato utilizado, tem uma grande influência no tipo de biossurfactante produzido (2).

✓ A produção de ramnolípidos por *Pseudomonas* spp. é inferior (2) quando são usadas fontes de carbono solúveis (miscíveis) em água, como glicerol, glicose, manitol e etanol, comparativamente com substratos imiscíveis em água, como n-alcanos (C12) e azeite (26,27);

✓ O rendimento é baixo quando apenas glicose ou óleo vegetal são usados para a produção do biossurfactante de *T. bombicola* (21) e dos soforolípidos de *C. bombicola* (28), mas aumenta quando ambas as fontes de carbono são fornecidas em conjunto (23). O mesmo se verifica com a produção de soforolípidos por *C. lipolytica* em meios contendo glicose e óleo de canola, e de glicolípidos por *T. apicola* IMET 43747 num meio contendo glicose e óleo de girassol (2).

✓ Em meios contendo glicose, a suplementação com hexadecano resulta num aumento do rendimento da produção de biossurfactante (em *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558) (29), e facilita a sua libertação das células (em *Corynebacterium lepus*) (30).

✓ Diferentes fontes de carbono no meio afetam a composição dos biossurfactantes de *Pseudomonas* spp., mas substratos com diferentes comprimentos de cadeia não exibem nenhum efeito no comprimento das cadeias das frações de ácidos gordos nos glicolípidos (27,31,32);

✓ Utilizando fontes de carbono prontamente disponíveis (neste caso, a glicose) ocorre uma reduzida produção de biossurfactantes; apenas quando todo o carbono solúvel é consumido e quando o hidrocarboneto imiscível em água está disponível, é que é desencadeada a produção de biossurfactante (33).

2. Fonte de nitrogénio

Evidências fundamentadas levam a crer que os constituintes do meio, além da fonte de carbono, também afetam a produção de biossurfactantes (2), sendo o nitrogénio, em concreto, considerado o segundo suplemento mais importante para a produção de biossurfactantes por microrganismos (23).

✓ Os sais de amónio e a ureia são as fontes preferidas de nitrogénio para a produção de biossurfactante por *Arthrobacter paraffineus*, que produz mais biossurfactante com a adição de L-aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glicina) ao meio (2);

✓ Em comparação com o amónio, a assimilação de nitrato é mais lenta e simula a limitação do nitrogénio, o que favorece a produção de ramnolípidos (23). O nitrato suporta a produção máxima de surfactante em *P. aeruginosa* (26,34,35) e *Rhodococcus* spp., crescendo em azeite e parafina, respetivamente (2);

✓ Com a surfactina, a suplementação de L-valina ou L-isoleucina ao meio de cultura resulta num aumento seletivo da produção da surfactina-Val⁷, ao passo que a adição L-leucina reduz significativamente essa produção (36). Da mesma forma, a produção de liquenisina-A é aumentada duas e quatro vezes pela adição de ácido L-glutâmico e L-asparagina, respetivamente, ao meio (2);

✓ No caso da produção de lípidos de soforose pelos fungos *T. bombicola* e *C. Bombicola*, extrato de levedura e ureia revelaram ser fontes de nitrogénio que suportam um elevado rendimento em biossurfactante (37), assim como nitrato de amónio e extrato de levedura no caso da produção de manosileritritol lipídico por *Candida* sp. SY16, *C. lipolytica* e *C. glabrata* (23);

✓ A limitação de nitrogénio parece provocar o aumento da produção de biossurfactantes em *P. aeruginosa*, *C. tropicalis* IIP-4 e *Nocardia* (2);

✓ A limitação de nitrogénio não só provoca superprodução de biossurfactante, mas também altera a composição do biossurfactante produzido (11).

✓ É a quantidade absoluta de nitrogénio e não a sua concentração relativa que parece ser importante para o rendimento ideal da biomassa (38).

3. Condições de crescimento

Fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigénio também afetam a produção de biossurfactante, através dos respetivos efeitos no crescimento ou atividade celular (2).

Vários estudos demonstraram que o pH do meio desempenha um papel importante na produção de biossurfactantes: várias espécies produzem rendimentos máximos numa ampla faixa de pH: pH 5,7 para *C. glabrata* UCP1002, pH 7,8 para *Candida* sp., pH 5,0 para *C. lipolytica*, pH 6,0 para *C. batistae*, pH 5,5 para *Pichia ananola* e pH 7,0 para *Aspergillus ustus* (2).

Da mesma forma, a temperatura provoca alteração na composição de alguns biossurfactantes (*Pseudomonas*); a temperatura mais favorável para a produção de SACs por vários fungos é 30°C (por exemplo: *C. bombicola*, *C. batistae* e *T. bombicola* (23)), mas o tratamento térmico de outros biossurfactantes não leva a nenhuma mudança apreciável nas suas propriedades (nomeadamente a redução da tensão superficial/ interfacial e a eficiência da emulsificação) (39). No caso de *C. lipolytica*, verificou-se que 27 °C é a melhor temperatura (2).

Já um aumento na velocidade de agitação pode resultar, em alguns casos, na redução do rendimento da produção de biossurfactantes devido ao efeito de cisalhamento (por exemplo, *Serratia* sp. SVGG16 cultivada numa cultura de hidrocarbonetos (40), *Nocardia erythropolis* e *A. calcoaceticus* RAG-1) (40). No entanto, noutros casos, o aumento da agitação pode resultar numa maior acumulação de biossurfactantes quer por leveduras (2), quer por *P. aeruginosa* UCP 0992 cultivada em glicerol (41) e *P. alcaligenes* cultivada em óleo de palma (42).

Também a transferência de oxigénio é um dos parâmetros-chave para a otimização do processo e aumento da escala da produção de surfactantes como, por exemplo, a surfactina em *Bacillus subtilis* (43), assim como a presença de Fe^{2+} num meio salino mineral (44). Isto porque a produção de alguns biossurfactantes também é afetada pela concentração de iões metálicos, dado que estes constituem importantes cofatores de algumas enzimas (44).

A concentração de sal (NaCl) – salinidade - também afeta a produção de biossurfactantes, dependendo do seu efeito na atividade celular. No entanto, alguns produtos não são afetados por concentrações de sal de até 10% (p/v), embora se detetem pequenas reduções nas respetivas CMCs⁵, indicando um aumento da atividade dos mesmos na presença de NaCl (39).

4.4 Matérias-primas para a produção de biossurfactantes

A sociedade atual é caracterizada pelo aumento de gastos, pela necessidade de reaproveitamento de materiais e por preocupações ambientais. Os resíduos industriais têm, por isso, despertado bastante interesse como um substrato de baixo custo para a produção de biossurfactantes, em especial os com alto teor de carboidratos ou lípidos. Mas a seleção dos produtos residuais deve garantir o equilíbrio adequado de nutrientes para permitir o crescimento microbiano e a consequente produção de biossurfactantes (23).

⁵ Concentração Micelar Crítica

Vários produtos residuais são empregues na produção de biossurfactantes, incluindo: óleos vegetais, efluentes oleosos, efluentes amiláceos, gordura animal, gordura vegetal, resíduos de óleo vegetal de cozinha, melaço, resíduos da indústria de laticínios (soro do leite), licor de maceração de milho, efluente residual da farinha de mandioca, entre outros (23).

1. Efluente de moinho de azeite (*Olive Oil Mill Effluent* - OOME)

O OOME⁶ é um licor negro concentrado com uma região solúvel em água, usado para a extração do azeite. Possui polifenóis que representam um desafio em termos de impacto ambiental. No entanto, também contém compostos de nitrogénio, óleo residual e ácidos orgânicos. Já foi usado com *Pseudomonas* sp. para produzir ramnolípidos (23).

2. Gordura animal

A gordura animal estimula a produção de soforolípidos pela levedura *C. bombicola* (45), e em conjunto com licor de maceração de milho, é possível atingir a produção máxima de glicolípidos pela levedura *C. lipolytica* UCP 0988 (46,47), que revelaram ter uso na biorremediação e na mobilização e recuperação de petróleo (23).

3. Óleos de Fritura

Óleo de fritura e gorduras comestíveis são considerados grandes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes, em particular as gorduras de origem vegetal. O óleo de babaçu (5% v/v) com fonte de carbono (1% glicose p/v), o óleo de girassol e o azeite têm-se mostrado fontes adequadas de energia e carbono para a produção de biossurfactantes. Resíduos de óleo de canola e nitrato de sódio têm sido relatados como adequados para crescimento microbiano e produção de ramnolípidos, sendo que a combinação de glicose e óleo de canola tem sido usada para a produção bem-sucedida de um biossurfactante por *C. lipolytica* (48).

4. Melaço

O melaço é um subproduto (barato) do processamento da cana-de-açúcar e da beterraba. É composto por matéria seca, matéria orgânica não açucarada, proteína, potássio, magnésio, fósforo e cálcio; os teores de inositol, biotina, tiamina e ácido pantoténico conferem ao melaço uma consistência espessa e tom acastanhado. O seu alto teor de açúcar (48% -56%) torna-o adequado para a produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos, como por exemplo, várias estirpes de *Bacillus* (49).

5. Soro de leite/ *Whey*

A indústria de laticínios produz grandes quantidades de soro de leite, soro de queijo, soro de coalhada e soro láctico (este último que possui elevada quantidade de lactose), todos os quais podem ser usados como substratos para a produção microbiana de metabolitos (50). Outros componentes, como proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos, são boas fontes para o crescimento microbiano e produção de biossurfactante; no entanto, o descarte do soro de leite representa um grande problema de poluição, especialmente em países cuja economia depende da indústria dos laticínios (51). Assim, o despojo deste produto secundário representa um

⁶ *Olive Oil Mill Effluent*

desperdício de substrato amplamente disponível mas também acarreta um risco ambiental (23).

6. Licor de maceração de milho

A agroindústria por via húmida resulta em subprodutos sólidos e líquidos, que, quando descartados de forma inadequada, constituem fonte de contaminação e danos para o meio ambiente. O licor de maceração de milho é um subproduto da agroindústria de produtos à base de milho que contém 40% de matéria sólida. É composto por proteínas, ácido láctico, cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , etc.), carboidratos e gordura de baixo teor (23).

Resíduos da refinaria do óleo de nozes e licor de maceração de milho constituem nutrientes de baixo custo para a produção de glicolípidos por *C. sphaerica* (UCP 0995), úteis para biorremediação (52). E um meio mineral suplementado com 2,0% de licor de maceração de milho e 2,0% de óleo de fritura residual de soja favorece a produção de um biossurfactante de *P. cepacia* (53)

7. Substratos amiláceos

Substratos abundantes à base de amido também constituem fontes renováveis de carbono. A indústria de processamento da batata, por exemplo, produz quantidades significativas de resíduos ricos em amido que são adequados para a produção de biossurfactantes, sendo constituídos maioritariamente por água (80%), carboidratos, proteínas, gorduras, minerais inorgânicos, elementos vestigiais e vitaminas. A água residual da mandioca, um produto residual rico em carboidratos gerado em grandes quantidades, tem sido usada para a produção de surfactina por *B. Subtilis*. Outros resíduos amiláceos, como água de arroz e água residual do processamento de cereais, também têm o potencial de permitir o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes (23).

4.5. Cinética de fermentação

A cinética da produção de biossurfactantes apresenta variações consideráveis entre os vários sistemas de classificação. No entanto, algumas generalizações podem ser feitas, sendo os parâmetros cinéticos agrupados em quatro tipos (2,23):

- (1) produção associada ao crescimento (“*growth-associated*”);
- (2) produção sob condições limitantes do crescimento;
- (3) produção por células em repouso ou imobilizadas;
- (4) produção com suplementação de precursores.

Na produção “*growth-associated*”, verifica-se uma relação paralela entre crescimento, utilização de substrato e produção de biossurfactante (figura 8.A). Exemplos incluem a produção de um ramnolípido por algumas *Pseudomonas* spp., glicoproteína AP-6 por *P. fluorescens* 378 e biodispersan por *Bacillus* sp. estirpe IAF-343 (2).

A **produção sob condições limitantes do crescimento** é caracterizada por um aumento acentuado na concentração de biossurfactante como resultado da limitação de um ou mais componentes do meio (figura 8.B). Exemplos são a superprodução de biossurfactantes por *Pseudomonas* spp. quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento devido à limitação de nitrogênio e ferro. A concentração de ferro tem um efeito dramático na produção de ramnolípido por *P. aeruginosa*, resultando num aumento de três vezes na produção quando as células são deslocadas do meio contendo mais ferro para um meio mais pobre em ferro (2).

A **produção por células em repouso ou imobilizadas** é um tipo de produção de biossurfactante em que não há multiplicação celular. As células, no entanto, continuam a utilizar a fonte de carbono para a síntese de biossurfactantes (figura 8.C). São exemplo a produção de ramnolípido por *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa* CFTR-6, a produção de soforolípido por *Torulopsis bombicola* e *Candida apicola*, a produção de celobiolípido por *Ustilago maydis* (59), a produção de tetraester de trealose por *Rhodococcus erythropolis*, entre outros. A produção por células em repouso é importante para a redução do custo de recuperação do produto, pois as fases de crescimento e formação do produto podem ocorrer separadamente (2).

Já a **adição de precursores** do biossurfactante ao meio de crescimento provoca alterações qualitativas e quantitativas no produto. Por exemplo, a adição de compostos lipofílicos ao meio de cultura de *T. magnoliae*, *T. bombicola* e *T. apicola* IMET 43747 resulta no aumento da produção de biossurfactante. Da mesma forma, a suplementação com o açúcar (carboidrato) correspondente no meio de crescimento leva ao aumento da produção de biossurfactantes contendo diferentes mono-, di- ou trissacarídeos em *Arthrobacter paraffineus* DSM 2567 (133), *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp. e *Brevibacterium* spp. (2).

Na figura 8 segue-se um esquema ilustrativo dos diferentes tipos de cinética de fermentação referidos (2).

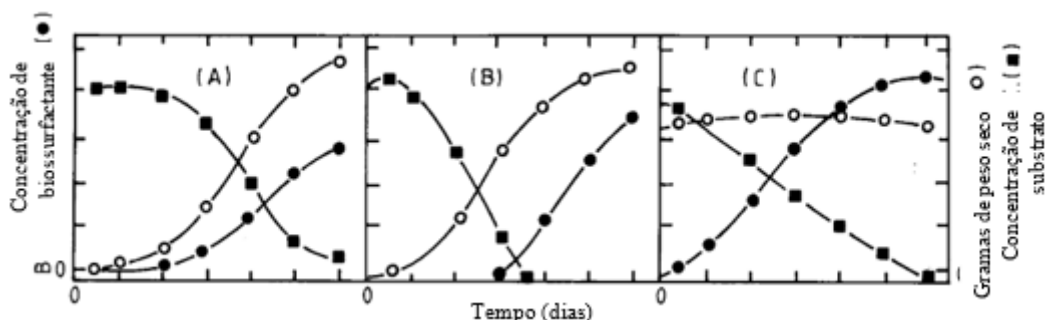


Figura 8 - Ilustração esquemática com os diferentes tipos de cinética de fermentação para produção de biossurfactantes

(A) Produção "growth-associated" (B) Produção sob condições limitantes de crescimento (C) Produção de biossurfactante por células em repouso ou imobilizadas (2)

4.6. Aplicações dos glicolípidos

As propriedades únicas dos biossurfactantes são consideradas vantajosas sobre outros tensoativos químicos, sendo, por isso, uma boa alternativa a esses produtos (25).

Atualmente, os biossurfactantes são muito usados na *Recuperação Melhorada de Petróleo* (MEOR) e na biorremediação de hidrocarbonetos. Mas também têm potenciais aplicações em outros tantos campos como seja agricultura, cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes, produtos de higiene pessoal, processamento de alimentos, manufatura têxtil, lavanderia, tratamento e processamento de metais, processamento de papel e celulose e indústria de tintas (54).

A Tabela 2 mostra um resumo das funções e aplicações comerciais e industriais dos biossurfactantes.

Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes (1,10)

Função	Aplicações
Emulsionante e dispersante	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizante	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agente molhante e penetrante	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergente	Produtos de limpeza, agricultura
Agente espumante	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agente espessante	Tintas e alimentos
Sequestrante de metais	Mineração
Formador de vesículas	Cosméticos e sistemas de libertação de fármacos
Fator de crescimento bacteriano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificante	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutor de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersante	Misturas carvão-água, calcário-água
Fungicida	Controlo biológico de fitopatogénios
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

4.6.1. Indústria Petrolífera

O petróleo é um dos mais importantes recursos energéticos e matérias-primas da indústria química (12). No entanto, a indústria petrolífera produz uma grande quantidade de resíduos perigosos, para além dos derramamentos de petróleo durante a exploração, transporte e refinação, que têm provocado sérios problemas ambientais (12).

Os métodos físico-químicos convencionais podem remover rapidamente a maior parte do petróleo derramado, mas, na maioria dos casos, a sua remoção acaba por simplesmente transferir contaminantes de um meio ambiental para outro, podendo inclusivamente produzir subprodutos tóxicos (12). Além disso, o petróleo bruto não pode ser totalmente limpo recorrendo a métodos físico-químicos (12).

A libertação de contaminantes (petróleo e derivados) no meio ambiente é uma das principais causas da poluição global e tornou-se um foco de grande preocupação em países

industrializados e em desenvolvimento devido à ampla distribuição ambiental (no solo, águas subterrâneas e ar). As fontes de contaminação são diversas: acidentes durante o transporte de combustível por navios e caminhões; derrame de tanques subterrâneos sujeitos a corrosão (como postos de gasolina); extração de petróleo e operações de processamento; liberação inadequada de resíduos gerados por indústrias que fazem uso de derivados de petróleo na produção de plásticos, solventes, produtos farmacêuticos e cosméticos (12).

Nesse sentido, os biossurfactantes desempenham um papel importante nos processos de biorremediação devido à sua eficácia como agentes de dispersão e remediação, bem como pelas suas propriedades ecológicas, sendo usados na limpeza de derramamentos de petróleo, remoção de resíduos de petróleo de tanques de armazenamento, recuperação microbiana de petróleo e biorremediação de solo e água (12).

Na indústria do petróleo, os biossurfactantes também têm uma ampla gama de aplicações biotecnológicas. Todas as operações, incluindo exploração e produção de óleo, refinação, transporte, manuseamento do produto, gestão de resíduos e poluição acidental podem ser melhorados, otimizados ou aumentados pelo uso de algum tipo de biossurfactante (55) (tabela 3).

Tabela 3 - Aplicações comuns dos biossurfactantes na indústria do petróleo (16)

Etapas na cadeia de produção de petróleo	Aplicação
Extração	Modificação da molhabilidade do reservatório
	Redução da viscosidade do petróleo
	Lama de perfuração (<i>Drilling mud</i>)
	Controlo da deposição de parafina/ asfalto
	Deslocamento do petróleo melhorado
Transporte	Redução da viscosidade do petróleo
	Estabilização da emulsão oleosa
	Deposição de parafina/ asfalto
Limpeza do tanque / recipiente do petróleo	Redução da viscosidade do petróleo
	Emulsificação de lodo oleoso
	Dispersão de hidrocarbonetos

Extração de petróleo bruto de reservatórios

Atualmente, em todo o mundo são empregues variados processos de recuperação de petróleo: térmico, químico, físico, entre outros. No entanto, estes processos são dispendiosos e prejudiciais para o meio ambiente (12). Assim, torna-se necessário encontrar alternativas, económicas e ecológicas. Os biossurfactantes têm aplicação neste domínio, visto que são capazes de melhorar a mobilização de hidrocarbonetos, aumentando assim a recuperação de

petróleo bruto a partir de reservatórios, num processo denominado *Recuperação Microbiana Melhorada de Petróleo* (MEOR⁷) (55).

A MEOR consiste numa tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos do seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (6), sendo mais económica em relação aos métodos convencionais, pois os microrganismos produzem produtos eficientes a partir de substratos ou matérias-primas de baixo custo (12).

Este processo envolve diferentes estratégias, nomeadamente:

- 1) Produção *ex-situ* em ambiente industrial usando biorreatores seguida de injeção no reservatório (55)
- 2) Aumento microbiano através da injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subsequente disseminação *in situ* (12)
- 3) Injeção de nutrientes no reservatório para estimular o crescimento de microrganismos selvagens produtores de biossurfactantes (55)

Todas estas estratégias aumentam a recuperação de petróleo a partir de um reservatório esgotado, reduzindo a tensão superficial óleo-rocha ao diminuir as forças capilares que impedem o movimento do petróleo através dos poros, estendendo assim a vida útil do reservatório. Para além disso, os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra de filmes de óleo nas rochas, importante para maximizar a extração e, em última análise, prolongar a vida útil do reservatório (55).

Transporte de petróleo bruto através de oleodutos

Na maioria das vezes o petróleo bruto tem de ser transportado por longas distâncias desde os campos de extração até às refinarias, o que envolve dificuldades operacionais que limitam a sua viabilidade económica (55). Os principais problemas associados são a baixa fluidez (devido à elevada viscosidade) e o teor de asfaltenos e parafinas no petróleo bruto pesado, que se podem depositar e provocar problemas de obstrução no oleoduto (55). Os asfaltenos precipitam em ductos de metal e na presença de iões férricos em condições ácidas, formando a chamada “lama de asfalto” (*asphaltene mud*), que se deposita no ducto e obstrui o fluxo de petróleo (12).

Nesse contexto foi desenvolvida uma tecnologia promissora envolvendo a produção de uma emulsão óleo em água estável que facilita a mobilidade do petróleo. Os **bioemulsificantes** (já referidos anteriormente como SACs de “alto peso molecular”) são particularmente adequados para esta aplicação (12). Estes, apesar de não serem tão eficazes na redução das tensões interfaciais como os glicolípidos e os lipopéptidos, têm uma excelente capacidade de estabilizar emulsões óleo/água. Devido ao grande número de grupos reativos nas moléculas, eles ligam-se fortemente às gotas de óleo e formam uma barreira eficaz que evita a sua coalescência (55). Um exemplo de compostos poderosos neste campo são o emulsan e análogos (12). Estas emulsões, ao chegar ao destino, podem ser utilizadas

⁷ *Microbial Enhanced Oil Recovery*

diretamente sem desidratação, ou tratadas com enzimas específicas para serem destruídas antes da utilização (55).

Limpeza de tanques de armazenamento de petróleo

Diariamente, grandes quantidades de petróleo bruto são distribuídas em refinarias e colocadas em tanques de armazenamento (55). No entanto, resíduos e frações de petróleo pesado que se acumulam no fundo e nas paredes dos tanques de armazenamento são altamente viscosas, formando depósitos sólidos incapazes de ser removidos com os métodos convencionais (12). A remoção deste material requer muitas vezes lavagem manual e uso de vapor, água quente ou solventes, que é um procedimento perigoso, demorado, oneroso e geralmente resulta na produção de grandes quantidades de resíduos (55).

O uso de biossurfactantes microbianos é um procedimento de limpeza alternativo para diminuir a viscosidade de sedimentos e depósitos através da formação de uma emulsão de óleo em água que facilita o bombeamento dos resíduos. Além disso, permite a recuperação do petróleo bruto quando a emulsão é destruída (12).

No entanto, pelo menos por enquanto, os biossurfactantes são dispersantes menos eficientes do que os produtos químicos e mais caros de produzir em grande escala (55).

Tratamento de resíduos de petróleo

Durante os processos de exploração, armazenamento, transporte e refinação do petróleo, é gerada uma quantidade considerável de lodo oleoso. O destino destes resíduos sempre foi um problema enfrentado pelas indústrias de petróleo. A lama oleosa é uma emulsão complexa de vários hidrocarbonetos de petróleo contendo partículas sólidas, água e metais pesados cujos métodos de tratamento eficazes se tornaram uma tecnologia muito procurada (55).

Diferentes opções tecnológicas foram adotadas por refinarias de petróleo em todo o mundo para a gestão dos resíduos gerados. Por exemplo: extração por solvente, desidratação e incineração, estabilização, pirólise, lavagem com água quente ou surfactantes e biodegradação. Mas estes métodos costumam ser onerosos e requerem equipamentos complexos, aumentando o custo e a complexidade. Assim, os métodos biológicos têm vindo a ser considerados mais adequados devido ao seu menor risco e maior seletividade a reações específicas. Várias investigações foram realizadas com vista a usar biossurfactantes no tratamento das lamas oleosas, já que a formação de emulsões óleo-água facilita o bombeamento do lodo e a sua destruição permite melhor recuperação do petróleo bruto (55). Um exemplo inclui o ramnolípido F-2 produzido por *P. aeruginosa*, que permitiu recuperar até 91,5% de óleo do lodo oleoso em estudos à escala piloto (18) .

Demulsificação

A demulsificação (“quebra da emulsão”) é especialmente importante na produção de petróleo bruto e no tratamento de águas residuais. Na produção de petróleo bruto são produzidas emulsões de água em óleo, que podem ser extremamente estáveis devido ao teor

de asfaltenos e resinas naturalmente presentes. Assim, a separação eficaz do petróleo bruto e da água é crucial em termos de qualidade do petróleo, mas também por forma a garantir uma elevada qualidade da fase aquosa separada ao menor custo possível (56). A separação da emulsão em óleo e água envolve a desestabilização do filme emulsificante em torno das gotas de água (55).

Os demulsificantes microbianos podem substituir o uso de químicos *in situ*, reduzindo a necessidade de transportar as emulsões para tratamento, fornecendo uma solução mais ecológica. Também são mais fáceis de remover e recuperar no final do processo. De entre os metabolitos microbianos utilizados destacam-se glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos e polissacarídeos (55).

Corrosão

A corrosão representa um grande problema para a indústria do petróleo. Todos os equipamentos usados são suscetíveis à corrosão, com consequentes efeitos negativos sobre o investimento no setor de petróleo.

Os agentes inibidores de corrosão (químicos, orgânicos ou mistos) têm sido o foco da pesquisa há muitos anos enquanto método mais prático de prevenção. Uma alternativa a estes é o uso de biossurfactantes. A sua maioria exhibe propriedades anticorrosivas e tem grande potencial para tal utilização por meio do condicionamento de superfícies metálicas para retardar o processo de corrosão. Um exemplo é o biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens*, que mostrou retardar significativamente a corrosão da superfície do aço inoxidável AISI 304 (57).

4.6.2. Biorremediação

Biorremediação marinha

Os constantes acidentes de derramamento de petróleo resultam numa contaminação significativa dos oceanos e ambientes costeiros. Assim, urge a necessidade de desenvolver vários produtos químicos, procedimentos e técnicas para combater a poluição por petróleo no mar e ao longo da costa (54).

Os biossurfactantes são um desses produtos químicos. Estes desempenham um papel importante nos processos de biorremediação devido à sua eficácia como agentes de dispersão e remediação, bem como pelas suas propriedades ecológicas, sendo usados na limpeza de derramamentos de petróleo, remoção de resíduos de petróleo de tanques de armazenamento, recuperação microbiana de petróleo e biorremediação de solo e água (12). A sua capacidade de emulsionar misturas de hidrocarbonetos e água aumenta a degradação dos hidrocarbonetos no meio ambiente. E a presença de microorganismos degradadores de hidrocarbonetos na água do mar torna a biodegradação um dos métodos mais eficientes para remoção de poluentes (58).

Exemplificando, o emulsificante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* SB30 mostrou ser capaz de dispersar rapidamente o petróleo em gotas finas, o que pode ser útil na remoção do mesmo em praias contaminadas (59).

Biorremediação do solo

Os biossurfactantes microbianos já demonstraram propriedades de biorremediação do solo contaminado com óleo residual de indústrias petrolíferas (60) e de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo (61).

A degradação de hidrocarbonetos por micróbios presentes no solo contaminado é o principal método para remover poluentes de hidrocarbonetos do solo (54). Mas os resultados existentes quanto à utilidade do uso de biossurfactantes na biodegradação de hidrocarbonetos são variáveis.

Os soforolípidos, por exemplo, quando adicionados a um sistema modelo contendo solo e uma mistura de hidrocarbonetos (tetradecano, pentadecano, hexadecano, pristano, fenildecano e naftaleno) em meio de sal mineral, permitem um aumento significativo da degradação de hidrocarbonetos (62). Já o emulsificante Emulsan mostrou estimular a mineralização aromática (fenantreno e carbazol) por culturas bacterianas puras, mas inibiu a degradação aromática por culturas mistas (63); e os biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UG2 aumentam a biodegradação de tetradecano, pristano e hexadecano nos solos mas não de 2-metilnaftaleno, o mais solúvel em água dos hidrocarbonetos (64).

4.6.3. Indústria Alimentar

Glicolípidos como emulsionantes alimentares e melhoradores da qualidade alimentar

Os biossurfactantes, em particular os **glicolípidos**, têm potencial para ser usados na indústria alimentar. De facto, como resultado da sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, são amplamente descritos como aditivos em alimentos (65).

A propriedade mais útil dos compostos tensoativos microbianos é a capacidade de formar emulsões estáveis, o que melhora as propriedades de textura e consistência dos produtos lácteos, bem como a dispersão de fase e a solubilização de aromas (6). Ao reduzirem a tensão interfacial e diminuírem a energia superficial entre as duas fases, estes compostos evitam a coalescência de partículas por meio da formação de barreiras de natureza estérica e eletrostática (9).

Os biossurfactantes também são usados para controlar a textura e a vida útil de produtos contendo amido, para melhorar a consistência e a textura de produtos à base de gordura, para aglomeração de glóbulos de gordura, entre outras. Em formulações de panificação e gelataria, são usados para melhorar a consistência, retardar o endurecimento, solubilizar óleos aromáticos e como estabilizadores de gordura (9).

Os ramnolípidos (**glicolípidos**), em particular, mostraram melhorar a estabilidade, textura, volume, forma e conservação da massa de produtos de panificação, e parece também melhorar

as propriedades do creme de manteiga, croissants e produtos de confeitaria congelados (65). Para além disso, podem servir como fonte de L-ramnose, um composto raro, usado comercialmente na produção de compostos aromatizantes de alta qualidade. É encontrado em vários polissacarídeos animais, vegetais e bacterianos, bem como nos ramnolípidos, nomeadamente os produzidos por *P. aeruginosa* (65), e já é usado industrialmente como um precursor de componentes de sabor como o furaneol (furanona de morango) (9).

O bioemulsificante produzido por *C. utilis*, por exemplo, tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (6). Os soforolípidos derivados de *C. bombicola* são capazes de emulsionar óleo de soja, azeite, óleo de girassol e óleo de mostarda (66).

Embora a adição de ramnolípidos tenha sido sugerida para melhorar as características da massa de produtos de panificação, o uso de compostos derivados de um patógeno oportunista como *P. aeruginosa* como ingredientes alimentares não é praticamente viável. Em vez disso, tem sido sugerido o uso de biossurfactantes obtidos de leveduras ou Lactobacilos, que são geralmente reconhecidos como seguros e já estão envolvidos em várias tecnologias de processamento de alimentos (7).

Glicolípidos com atividade antimicrobiana e antiadesiva

Os biossurfactantes glicolipídicos, dada a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, são amplamente descritos como aditivos em alimentos. Além disso, são bem conhecidos pela sua atividade antimicrobiana numa ampla variedade de bactérias (65); por exemplo, o **glicolípido** derivado das actinobactérias marinhas *Streptomyces* sp., que mostrou atividade antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella shiga*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella boydii*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (67).

Biossurfactantes no controlo de biofilmes

“Biofilmes” são agregados de microorganismos nos quais as células microbianas aderem a uma superfície e umas às outras. Incluem bactérias, uma mistura de material extracelular microbiano produzido na superfície e qualquer outro material preso dentro da matriz resultante (9). Na indústria alimentar representam uma grande preocupação porque podem ser uma fonte de contaminação persistente levando a uma deterioração de alimentos e transmissão de doenças. Para evitar a adesão de bactérias e a formação de biofilmes, uma alternativa é o pré-condicionamento de superfícies com biossurfactantes (65), por exemplo, o biossurfactante aniónico de *P. fluorescens* (68).

Os **glicolípidos** são um exemplo compostos usados; apresentam atividade antibacteriana e antiadesiva e inibem a formação de biofilmes de patógenos, diminuindo a suscetibilidade à contaminação microbiana, por exemplo do pão (65). Os ramnolípidos, em particular, têm algum papel na inibição de biofilmes complexos e como adjuvantes para aumentar a atividade de alguns antibióticos inibidores microbianos (9).

Biossurfactantes como agentes antioxidantes

Os biossurfactantes apresentam algum potencial como agentes antioxidantes. Exemplos incluem os versáteis lípidos de manosileritritol (MELs), um biossurfactante de *B. subtilis* RW-I e um emulsificante polissacarídeo de *Klebsiella*, que demonstrou ter uma inibição potente na autooxidação do óleo de soja (9).

4.6.4. Agricultura

Os agentes tensoativos são necessários para a hidrofilição de solos pesados para obter boa molhabilidade e também para alcançar uma distribuição homogênea de fertilizantes e pesticidas nos solos (54). Mas a sua principal aplicação na agricultura é na formulação de herbicidas e pesticidas. Por exemplo, surfactantes de *Bacillus* já foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis (6).

Atividade anti-fitopatogénica

Dos biossurfactantes com aplicação na agricultura, os **glicolípidos** são usados como biopesticidas para controlar fungos fitopatogénicos, pragas, patogénios e ervas daninhas.

Os biossurfactantes soforolipídicos mostraram ser ativos contra vários patogénios fúngicos e bacterianos de plantas. E os biossurfactantes ramnolipídicos possuem potencial para o controlo biológico de fitopatogénios que produzem zoósporos (6), permitindo o seu uso na agricultura para a proteção de plantas, em particular os ramnolípidos derivados de *P. aeruginosa* (65).

Atividades inseticida e mosquitocida

Existem poucos estudos sobre o uso de biossurfactantes glicolipídicos como (bio)pesticidas para o controlo da invasão de insetos e mosquitos. Mas alguns biossurfactantes ramnolipídicos (poucos no entanto), já foram descritos como agentes inseticidas e mosquitocidas, revelando-se eficientes no biocontrolo de pragas como aracnídeos, ovos, larvas, gafanhotos e percevejos do sabugueiro (65).

Estimulação das defesas das plantas

Estudos recentes também mostraram que alguns ramnolípidos têm efeitos protetores nas plantas contra a infestação de fungos fitopatogénicos e bactérias por meio da estimulação do sistema imunológico das mesmas (65).

Estes compostos são capazes de: desencadear fortes respostas de defesa na videira (nomeadamente contra o patógeno necrotrófico *B. cinerea*); induzir resistência a doenças provocadas por bactérias e fungos; induzir a biossíntese das hormonas vegetais ácido salicílico, ácido jasmónico e etileno, envolvidos na imunidade das plantas (69); estimular genes de defesa nas plantas do tabaco, trigo e *Arabidopsis thaliana*; e proteger plantas monocotiledóneas contra fungos biotróficos (70).

4.6.5. Mineração

Os biossurfactantes podem ser usados para a dispersão de minerais inorgânicos em processos de mineração e manufatura.

O biodispersan, por exemplo, surfactante polimérico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, previne a floculação, é dispersante e surfactante, e catalisa a fratura do calcário em partículas de menores dimensões (54). E biossurfactantes de *C. bombicola* demonstraram eficiência na solubilização do carvão (71). Já compostos como surfactina, ramnolípidos e soforolípidos foram usados para remoção de metais pesados de sedimentos (72).

4.6.6. Cosméticos

As indústrias de cosméticos e cuidados com a saúde usam grandes quantidades de surfactantes para uma ampla variedade de produtos. Estes são usados como emulsionantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes humectantes e agentes de limpeza. Produtos que requerem surfactantes entre os seus ingredientes incluem repelentes de insetos, antiácidos, almofadas para a acne, produtos anticaspa, soluções para lentes de contato, desodorizantes, produtos para o cuidado das unhas, pastas de dentes, etc. (73).

Devido à sua baixa toxicidade, excelentes propriedades hidratantes e compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. A título de exemplo, um produto comercial com soforolípidos (1 mol) e propilenoglicol, (12 moles) apresentou excelente compatibilidade dérmica, sendo utilizado como hidratante em cremes faciais (6).

Alguns soforolípidos são utilizados como humectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. Ltd desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolípidos, que posteriormente sofrem esterificação, resultando num produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (6).

4.6.7. Aplicações terapêuticas

Os biossurfactantes têm também algumas aplicações terapêuticas.

Os **glicolípidos** são a classe mais comum de biossurfactantes e, apesar de muitos dos estudos efetuados destacarem o seu uso em processos ambientais e de biorremediação, estas moléculas também apresentam aplicações terapêuticas, já que atuam como compostos biologicamente ativos na (bio)medicina, particularmente como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e agentes de diferenciação celular (25).

Alguns podem ser usados como auxiliares de emulsificação para veiculação de fármacos para o local de infeção, para suplementação do surfactante pulmonar e como adjuvantes para vacinas (16,73).

4.6.7.1. Atividades biomédicas e terapêuticas dos biossurfactantes

A **Tabela 4** resume várias aplicações biológicas, biomédicas e terapêuticas de alguns dos biossurfactantes mais utilizados.

Tabela 4 - Aplicações terapêuticas dos biossurfactantes (adaptado 4,71)

Biossurfactante	Organismo produtor	Aplicações
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Atividade antimicrobiana contra <i>M. tuberculosis</i> Atividade antiadesiva contra várias estirpes bacterianas e de leveduras isoladas de próteses vocais
Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i>	Atividade antimicrobiana contra Gram-positivos, por exemplo <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> e <i>Corynebacterium xerosis</i> (bactéria responsável pela acne). Potencial aplicação na indústria de produtos cosméticos, higiênicos e farmacológico-dermatológicos (25)
Surfactina (3 tipos: A, B, C)	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente antimicrobiano e antifúngico Ação anticoagulante (inibição da formação de coágulos de fibrina) Hemólise e formação de canais iônicos nas membranas lipídicas Inibição do cAMP ⁸ Inibição da PLA2 ⁹ citosólica das plaquetas e do baço Atividade antitumoral contra o carcinoma ascítico de Ehrlich-Lettré Atividade antiviral contra HIV-1, vírus Semliki Forest, vírus da pseudo-raiva, vírus da estomatite vesicular, vírus da imunodeficiência símia, calicivírus felino e vírus da encefalomiocardite murina (provavelmente devido a uma interação físico-química entre o surfactante da membrana e a parte externa da bicamada lipídica do vírus) Atividade antifúngica
Pumilacidina (análogo da surfactina)	<i>Bacillus pumilus</i>	Atividade antiviral contra HSV-1 Atividade inibitória contra H ⁺ e K ⁺ -ATPase Ação protetora contra úlceras gástricas <i>in vivo</i> (provavelmente pela inibição da atividade microbiana que contribui para essas úlceras)
		Atividade antimicrobiana Atividade antifúngica contra micose profunda

⁸ Adenosina-monofosfato cíclico

⁹ Fosfolipase A2

Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>	Efeito na morfologia e estrutura da membrana das células de levedura Aumento na condutância elétrica das membranas lipídicas biomoleculares Adjuvante imunológico não tóxico e não pirogênico, quando adicionado a antígenos convencionais
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Atividade antibacteriana Propriedades quelantes (que podem explicar o efeito de desregulação da membrana dos lipopéptidos)
Lípidos de manosileritritol (MELs)	<i>Candida antarctica</i>	Propriedades antimicrobianas, imunológicas e neurológicas Indução da diferenciação na linha celular da leucemia promielocítica humana HL60 Indução da diferenciação neuronal em células PC12
Lípidos de succinil-trealose	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Atividade antifúngica e antiviral contra HSV e vírus <i>Influenza</i>
Dicorinomicolato de trealose	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Propriedades antifúngicas
Surlactina	<i>Lactobacillus</i>	Atividade antiadesiva em materiais de cateter, eficaz contra vários patógenos, incluindo bactérias entéricas
Lipopéptidos	<i>Streptosporangium amethystogenes</i> sub sp. <i>fukuiense</i> AI-2345	Indução da atividade do G-CSF ¹⁰ e do GM-CSF ¹¹

A importância dos biossurfactantes enquanto agentes antimicrobianos nas áreas médica, farmacêutica e terapêutica poderá ser devida à sua capacidade de romper ou danificar a membrana celular, o que leva à lise celular pelo aumento da permeabilidade da membrana e do fluxo de metabolitos. Isto acontece devido a mudanças na estrutura física da membrana pela interrupção da sua conformação proteica, o que altera funções como transporte e produção de energia. Este efeito é particularmente eficaz em organismos procarióticos Gram-positivos, fungos e alguns vírus (7,22).

Alguns glicolípidos funcionam como **biossondas**, controlando várias funções nas células dos mamíferos. Participam em mecanismos de reconhecimento intercelular e resposta imunológica (74), sendo por isso de grande interesse em várias patologias dadas as suas funções biológicas e o seu potencial para usos terapêuticos (25). Algumas dessas atividades incluem: efeitos anticancerígenos nos cânceres do pulmão, colo do útero, mama e cérebro (75), o mecanismo de regulação da angiogénese e a apoptose (25).

Os **ramnolípidos** (RL) têm demonstrado atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de fungos e patógenos, e têm ação direta na estrutura da superfície da célula

¹⁰ Fator estimulador de colónias de granulócitos

¹¹ Fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos

bacteriana. Em *P. aeruginosa* (Gram negativa) na presença de baixas concentrações de ramnolípidos, foi observada uma diminuição na proregião de lipopolissacarídeos, aumentando a hidrofobicidade da superfície celular e causando alterações nas proteínas da membrana e, portanto, na morfologia da superfície da célula (76).

Na área biomédica, os ramnolípidos produzidos por *P. aeruginosa* isolados de subprodutos lácteos apresentaram boa atividade de superfície e efeitos antiproliferativos contra células do cancro da mama humano (77).

Os **lípidos de manosileritritol** (MEL¹²), biossurfactantes glicolipídicos produzidos a partir de óleos vegetais por estirpes de *Candida*, exibem atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias Gram-positivas (16).

Além disso, os lípidos de manosileritritol demonstraram elevada afinidade de ligação à imunoglobulina humana G (HIgG). Daí foi sugerida a possibilidade de usar o lípido de manosileritritol A (MEL-A) como um ligante alternativo para imunoglobulinas. Em estudos subsequentes, foram avaliados MEL-A, MEL-B e MEL-C ligados a grânulos PHEMA¹³ quanto à sua afinidade de ligação a HIgG. Destes três compostos, aqueles com MEL-A exibiram a maior capacidade de ligação para HIgG, indicando um grande potencial dos glicolípidos enquanto agentes ligantes de afinidade (16)

Os glicolípidos **MEL** também são capazes de inibir o crescimento de células B16 de melanoma de rato de forma dependente da dose, estimular a expressão de marcadores de diferenciação das células de melanoma (o que indica que os MEL desencadeiam mecanismos tanto apoptóticos como de diferenciação celular), aumentar a atividade da acetilcolinesterase, interromper o ciclo celular na fase G1 (com consequente crescimento de neurites e diferenciação celular parcial (16)), induzir a atividade de tirosinases e aumentar a produção de melanina (25).

De entre as outras propriedades biomédicas atribuídas a estes compostos, também foi investigada a propriedade de ativação celular a partir de fibroblastos cultivados e células de papila, bem como um modelo tridimensional de pele humana cultivada. MEL-A, produzido a partir de óleo de soja, aumenta significativamente a viabilidade dos fibroblastos e das células da papila em mais de 150%, o que sugere o potencial uso como um novo agente de crescimento capilar estimulando as células da papila (78).

C. antarctica T-34 produz uma série de 6 glicolípidos microbianos: MEL-A e MEL-B, com atividade contra bactérias Gram-positivas (22)), lípidos de poliol, lípidos de sofrorse (SL) e lípidos de succinil-trealose 1 e 3 (STL-1 e STL-3). Estes compostos mostraram induzir a diferenciação de células na linha celular da leucemia promielocítica humana (HL60). Também provaram induzir as linhas celulares da leucemia mieloide humana (K562) e da

¹² Mannosylerythritol lipids

¹³ poli (2-hidroxietil metacrilato)

leucemia basofílica humana (Ku812) a diferenciarem-se em monócitos, granulócitos e megacariócitos (75).

Também já foram investigados os efeitos de alguns destes tipos de glicolípidos extracelulares na neuritogênese em células PC12 (linhagem celular derivada de um feocromocitoma de rato). Um crescimento significativo de processos neuronais (neurites) ocorre como consequência da adição de MEL-A, MEL-B e SL às células PC12. MEL-A induz o crescimento neuronal em células PC12 após tratamento com um anticorpo recetor anti-NGF que obstrui a ação de NGF (fator de crescimento neuronal) (25), aumenta a atividade da acetilcolinesterase numa extensão semelhante ao NGF, e aumenta os níveis de galactosilceramida das células PC12 (16).

Por sua vez, os **lípidos de trealose** (TL-1 e TL-2) e os **lípidos de succinoil-trealose** (STL-1 e 2) não apresentam propriedades inibitórias sobre bactérias Gram-negativas e leveduras. No entanto, TL-1 apresenta atividade antifúngica ao inibir a germinação de conídios de *Glomerella cingulata* na concentração de 300 mg/L, enquanto que STL-1 e -2 apresentam propriedades antifúngicas e antivirais, sendo capazes de inibir os vírus *Herpes simplex* e *Influenza* em concentrações de 11 a 33 mg/L (22).

Um dos **lípidos de succinoil-trealose** (STL) produzido por *Rhodococcus* sp., mostrou causar edema dos eritrócitos humanos seguido por hemólise em concentrações abaixo da sua concentração micelar crítica. A explicação possível é que os lípidos de trealose provocam hemólise dos eritrócitos humanos por um mecanismo coloide-osmótico, muito provavelmente pela formação de áreas com permeabilidade aumentada ou poros na membrana eritrocitária (79).

Já os **xilolípidos**, produzidos por bactérias probióticas como *Lactococcus lactis* utilizando parafina como fonte de carbono, apresentam atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *S. aureus* multirresistentes. Estes glicolípídios apresentam, assim, um elevado potencial como alternativa ao uso de medicamentos para administração oral e transdérmica (80).

Os **soforolípidos**, por sua vez, são novos e promissores moduladores da resposta imunológica em modelos animais. Estes atuam suprimindo a produção de IgE e diminuindo a inflamação pulmonar em modelos de camundongos. Consequentemente, são potenciais novos agentes anti-inflamatórios com potencial terapêutico para a cura de certas doenças associadas a alterações na regulação da IgE (81).

4.6.7.2. Atividade antiadesiva dos glicolípidos

Os glicolípidos possuem outro mecanismo de atividade **antioxidante**, que ocorre quando impedem a adesão microbiana e a formação de biofilmes (25).

De forma simplificada, pode dizer-se que os **biofilmes** são populações ou comunidades de bactérias que vivem em estruturas organizadas numa interface líquida (82). A primeira etapa para o estabelecimento da colónia é a adesão bacteriana, que é influenciada pelo tipo de microrganismo, hidrofobicidade da superfície, cargas elétricas, condições ambientais e a capacidade dos microrganismos em produzir polímeros extracelulares que auxiliam as células a aderirem à superfície. Os biofilmes são, assim, importantes na patogénese de diversas infeções bacterianas, dado que a adesão de patógenos aos tecidos do hospedeiro é o requisito inicial para a maioria das doenças infecciosas (25). Por exemplo, as infeções hospitalares por patógenos como *Staphylococcus* spp. podem ocorrer através da formação de biofilmes nos cateteres e outros acessórios médicos. Além disso, acredita-se que a placa dentária, a fibrose cística, a pneumonia e a endocardite infecciosa sejam causadas por bactérias formadoras de biofilmes (83). Outros relatos indicam que a resistência aos antibióticos é uma característica geral associada às bactérias dos biofilmes (82), sendo que uma das teorias que sustentam essa afirmação é que a penetração do antibiótico é menor através da estrutura do biofilme (84).

Tem sido relatado que os biossurfactantes são capazes de inibir a adesão de organismos patogénicos a superfícies sólidas ou a locais de infeção, logo, a adesão prévia de biossurfactantes a superfícies sólidas pode constituir um meio inovador e eficaz de combater a colonização por patógenos. O pré-revestimento de cateteres uretrais de vinil fazendo passar uma solução de **surfactina** através deles antes da inoculação com meio resulta numa diminuição na quantidade de biofilme formada por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, e *Proteus mirabilis*. Isto é particularmente relevante dada a importância das infeções oportunistas com espécies de *Salmonella*, incluindo no trato urinário de doentes com SIDA (16).

Além disso, o uso de lactobacilos produtores de biossurfactante revelaram um possível papel probiótico na restauração e manutenção dos tratos urogenital e intestinal, sugerindo uma possibilidade de terapêutica alternativa confiável face aos antibióticos. O papel das espécies de *Lactobacillus* no trato urogenital feminino como barreira à infeção é de considerável interesse; acredita-se que estes organismos contribuem para o controlo da microbiota vaginal competindo com outros microrganismos pela aderência às células epiteliais e pela produção de biossurfactantes. Existem também relatos de inibição da formação de biofilmes (por uropatógenos e leveduras em borracha de silicone) através de biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (85).

Continuando em aplicações biomédicas, têm sido levados a cabo estudos para prevenir a colonização microbiana de próteses vocais de silicone (86,87). Os resultados obtidos mostram que os biossurfactantes provenientes de estirpes probióticas reduzem consideravelmente a quantidade de micróbios em próteses vocais e também induzem uma diminuição na resistência ao fluxo de ar das próteses vocais após a formação de biofilme, o que pode constituir uma forma de aumentar o tempo de vida útil destas (16).

Não obstante, o papel dos biossurfactantes como defesa na competição pós-adesão com outras estirpes ou espécies foi sugerido, até agora, apenas para biossurfactantes produzidos por *S. mitis* contra a adesão de *Streptococcus mutans* e para biossurfactantes libertados por lactobacilos contra a adesão de uropatógenos (16).

Outras aplicações

Algumas outras aplicações comerciais dos biossurfactantes incluem a indústria do papel e celulose, têxteis, cerâmica, indústria de tintas (biodispersan), processamento de minério de urânio, e, possivelmente, imunonutrição (73).

4.7. *Patologias associadas a glicolípidos e Ensaios Clínicos*

A **Doença de Gaucher** (DG) foi a primeira doença de armazenamento lisossomal (*storage disorder*) descrita, e recebe esse nome devido à acumulação de restos de células envelhecidas que são depositadas nos lisossomas (88). É uma doença genética autossômica recessiva e classifica-se como uma **esfingolipidose**, pois ocorre quando uma pessoa não possui as enzimas necessárias para decompor os esfingolípidos, compostos que protegem a superfície celular e desempenham determinadas funções nas células (89).

Esta doença é caracterizada por uma deficiência hereditária na atividade da enzima lisossomal **glucocerebrosidase** (ou β -glicosidase), que hidrolisa o glicolípido **glucosilceramida** em glicose e ceramida. Tal deficiência induz à acumulação de glucosilceramida levando a alterações histológicas, que são especialmente evidenciadas nos órgãos com maior abundância em elementos do sistema imunológico monocítico-fagocitário (como fígado, baço, nódulos linfáticos e medula óssea) (88). Consequentemente, as características clínicas incluem hepatoesplenomegalia progressiva, hiperesplenismo, lesões esqueléticas e, nas raras formas neuropáticas, doença neurológica (90). Este distúrbio é classificado em três tipos (1, 2 e 3), tendo como base a presença e a gravidade de envolvimento neurológico. (88).

O **tratamento** da doença de Gaucher pode ser feito recorrendo a transplantes de medula óssea (TMO) e terapia genética. No entanto, na maioria dos casos, recorre-se a terapia de substituição enzimática, com a administração quinzenal ou mensal da enzima em carência por via endovenosa. Uma outra opção terapêutica, indicada apenas para alguns doentes, é conhecida como terapia de redução do substrato (ou *terapia de privação de substrato*), na qual o objetivo é diminuir a síntese do substrato armazenado recorrendo a inibidores enzimáticos (91). O princípio é simples: se uma espécie de glicoesfingolípido (GSL) não puder ser completamente degradada como resultado da deficiência enzimática herdada, a biossíntese de menos moléculas de GSL¹⁴ reduzirá o influxo de GSLs no lisossoma, permitindo que todas as moléculas sejam catabolizadas (91). O objetivo é diminuir a taxa de acumulação do substrato, de forma a restaurar o equilíbrio metabólico (92). Se isso puder ser alcançado, o percurso da doença resultante do armazenamento de GSL será interrompido. Se o equilíbrio completo não puder ser alcançado, a doença apresentar-se-á numa forma menos grave, com uma taxa de progressão mais lenta (91).

¹⁴ glicoesfingolípidos

Em 1993, descobriu-se que o açúcar imino N-alkilado **N-butildesoxinojirimicina (NB-DNJ ou OGT 918)** inibe a glucosiltransferase específica da ceramida (GlcT-1), que catalisa o primeiro passo na via biossintética dos glicoesfingolípídeos (Figura 9), e cuja atividade inibitória é criticamente dependente de um comprimento mínimo da cadeia N-alkil de 3 átomos de carbono. Este composto foi desenvolvido como um composto antiviral pela empresa *Monsanto* na década de 1980; é oralmente disponível e muito estável em termos de temperatura e condições de armazenamento (91).

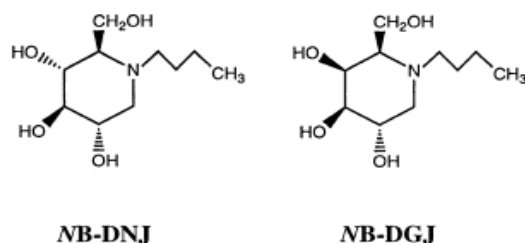


Figura 9 - Estruturas dos açúcares imino: NB-DNJ => análogo de glicose, NB-DGJ => análogo de galactose (89)

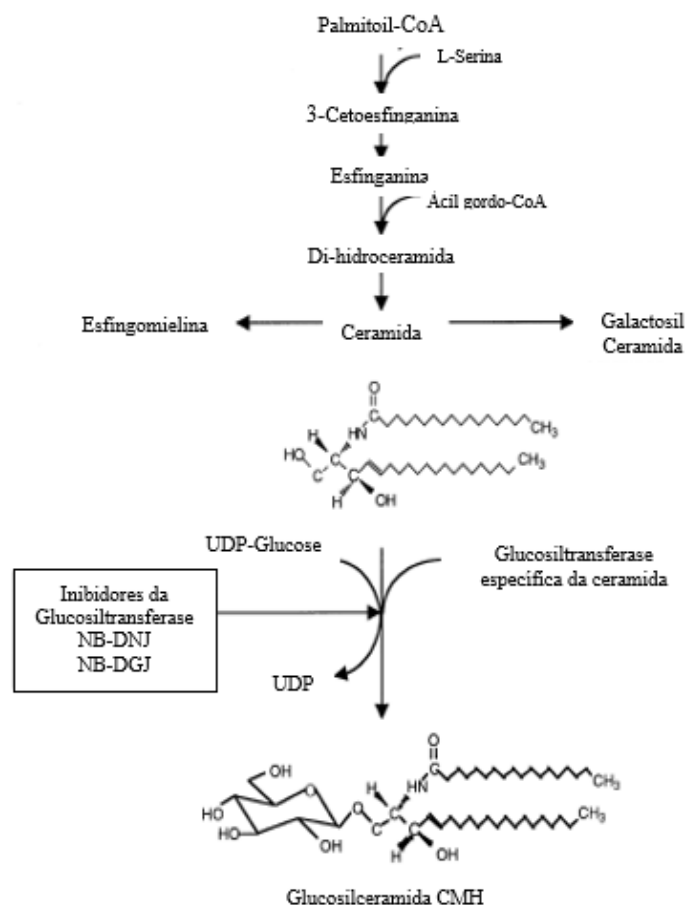


Figura 10 - Resumo da biossíntese de glicoesfingolípídeos destacando a biossíntese de GlcCer catalisada pela glucosiltransferase, que é a etapa da via sintética inibida por NB-DNJ e NB-DGJ (adaptado, 89)

Ensaio clínico bem-sucedido do iminoaçúcar N-butildesoxinojirimicina na doença de Gaucher tipo 1 comprovaram o princípio da terapia de redução de substrato, e têm atraído a

atenção para este método terapêutico (93). Também promoveram experiências adicionais importantes sobre o uso de inibidores da síntese de glicolípidos nas glicosíngolipidoses neuropáticas graves, para as quais ainda nenhum tratamento definitivo está disponível (93).

Timothy Cox et al. realizaram um estudo aberto de um ano em que foram recrutados 28 adultos (7 com esplenectomias anteriores) de quatro clínicas nacionais de referência, que não puderam ou não quiseram receber tratamento enzimático. Foram medidos o volume do fígado e do baço por tomografia computadorizada ou ressonância magnética, na linha de base e nos meses 6 e 12, e também variáveis bioquímicas e hematológicas, mensalmente, incluindo atividade de quitotriosidase (um marcador sensível da atividade da doença de Gaucher). Os pacientes iniciaram com 100 mg de OGT 918¹⁵ oral, três vezes ao dia (90).

Detetou-se que os volumes basais do fígado foram 1,1 a 2,7 vezes o normal e os volumes do baço 5,1 a 24,8 vezes o normal. O volume médio dos órgãos e as contagens sanguíneas melhoraram continuamente entre os 6 meses e os 12 meses de tratamento. Ao fim dos 12 meses, os volumes médios do fígado e do baço foram significativamente reduzidos em 12% e 19%, respetivamente. As variáveis hematológicas melhoraram ligeiramente. As concentrações médias de quitotriosidase caíram 16,4% ao longo dos 12 meses. Seis doentes desistiram devido a queixas gastrointestinais, motivos pessoais ou doença preexistente grave. O efeito adverso mais frequente foi diarreia, que ocorreu em 79% dos doentes logo após o início do tratamento (90).

Neste ensaio clínico, ficou demonstrado que a diminuição da formação de substrato pelo iminoaçúcar N-butildeoxinojirimicina melhora as principais características clínicas da doença de Gaucher não neuropática (90). De facto, os dados mostraram que o composto reverte muitos dos sinais clínicos e características laboratoriais da doença de Gaucher e pode ampliar as opções de tratamento dessa família de doenças metabólicas, incluindo aquelas com envolvimento do sistema nervoso (90). No entanto, é necessária exploração adicional em doentes com glicosíngolipidoses neuropáticas graves, para as quais ainda nenhum tratamento definitivo está disponível (93). OGT 918 pode ser usado como monoterapia, mas tem potencial adicional enquanto tratamento combinado com reposição enzimática (90), podendo levar a uma diminuição das doses de cada medicamento para beneficiar os doentes.

5. **Conclusão**

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados numa ampla gama de aplicações, nomeadamente as indústrias ambiental, petrolífera, alimentícia e cosmética (25). Mas não só; as características únicas destes compostos também permitem várias aplicações na área da saúde. Estes são úteis como agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais, mas também como moléculas imunomoduladoras, agentes adesivos, em vacinas e em terapia génica (16). Têm potencial para ser usados como revestimentos biológicos antiadesivos para materiais de inserção

¹⁵ OGT 918 é um inibidor reversível da glicosilceramida sintase

médica (por exemplo cateteres), reduzindo assim as infecções hospitalares e o uso de fármacos sintéticos e produtos químicos. Também podem ser incorporados em preparações probióticas para combater infecções do trato urogenital e em imunoterapia pulmonar (16).

No entanto, a sua utilização no campo médico é ainda limitada, possivelmente devido aos elevados custos de produção e extração e à falta de informação sobre a sua toxicidade nos sistemas humanos (16). É necessária mais pesquisa em células humanas e microbiota natural para validar a utilização de biossurfactantes em diversas áreas da biomédica e da saúde. No entanto, parece haver um grande potencial para que tal aconteça (16).

6. **Referências Bibliográficas**

1. Ferreira VR. InfoEscola [Internet]. Compostos tensoativos. [citado 14 de Março de 2022]. Disponível em: <https://www.infoescola.com/quimica/compostos-tensoativos/>
2. Desai JD, Banat IM. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Vol. 61, Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1997.
3. Sharma R. Surfactants: Basics and Versatility in Food Industries [Internet]. 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/328065896>
4. Biolin Scientific [Internet]. What are surfactants and how do they work? 2018 [citado 4 de Fevereiro de 2021]. Disponível em: <https://www.biolinscientific.com/blog/what-are-surfactants-and-how-do-they-work>
5. Felipe L de O, Dias S de C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. Química Nov na Esc. 2017;39(3):228–36.
6. Nitschke M, Pastore GM. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. Vol. 25, Química Nova. 2002.
7. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87(2):427–44.
8. Zajic JE, Guignard H, Gerson DF. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. Biotechnol Bioeng. 1977;19(9):1303–20.
9. Campos JM, Montenegro Stamford TL, Sarubbo LA, de Luna JM, Rufino RD, Banat IM. Microbial biosurfactants as additives for food industries. Vol. 29, American Institute of Chemical Engineers (AIChE). 2013.
10. Razafindralambo H, Paquot M, Baniel A, Popineau Y, Hbid C, Jacques P, et al. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. J Am Oil Chem Soc. 1996;73(1):149–51.
11. Kretschmer A, Bock H, Wagner F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. Appl Environ Microbiol. 1982;44(4):864–70.
12. Silva RCFS, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. Int J Mol Sci. 15 de Julho de 2014;15(7):12523–42.
13. Neu TR. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. Vol. 60, Microbiological Reviews. 1996.
14. Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 1999;52(2):154–62.
15. Bueno SM. Bactérias Produtoras De Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização E Comportamento Num Sistema Modelo [Internet]. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP; 2008. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100904/bueno_sm_dr_sjrp.pdf?sequence=1
16. Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. J Antimicrob Chemother. 2006;57(4):609–18.
17. Abdel-Mawgoud AM, Stephanopoulos G. Simple glycolipids of microbes: Chemistry,

- biological activity and metabolic engineering. *Synth Syst Biotechnol.* 1 de Março de 2018;3(1):3–19.
18. Kaskatepe B, Yildiz S. Rhamnolipid biosurfactants produced by pseudomonas Species. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2016;59(December):1–16.
 19. Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J Gen Microbiol.* 1979;115(2):491–503.
 20. Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Smyth TJP, Banat IM. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. Vol. 112, *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2010. p. 617–27.
 21. Cooper DG, Paddock DA. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47(1):173–6.
 22. Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T. Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants - from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers. *J Biosci Bioeng.* 2002;94(3):187–201.
 23. Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci.* 18 de Março de 2016;17(3).
 24. Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. Produção de biossurfactante por levedura. *Quim Nova.* 2008;31(8):2091–9.
 25. Cortés-Sánchez A, Hernández-Sánchez H, Jaramillo-Flores ME. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. Vol. 168, *Microbiological Research.* 2013. p. 22–32.
 26. Robert M, Mercadé ME, Bosch MP, Parra JL, Espuny MJ, Manresa MA, et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett.* 1989;11:871–4.
 27. Sylđatk C, Lang S, Matulovic U, Wagner F. Production of four interfacial active rhamnolipids from η -alkanes or glycerol by resting cells of pseudomonas species DSM 2874. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci.* 1985;40(1–2):61–7.
 28. Casas JA, García De Lara S, García-Ochoa F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb Technol.* 1997;21(3):221–9.
 29. Duvnjak Z, Cooper DG, Kosaric N. Production of Surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. *Biotechnol Bioeng.* 1982;XXIV:166–75.
 30. Duvnjak Z, Kosaric N. Production and release of surfactant by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and glucose media. *Biotechnol Lett.* 1985;7(11):793–6.
 31. Sylđatk C, Lang S, Wray V, Witte L. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from pseudomonas spec. DSM 2874 grown on η -alkanes. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci.* 1985;40(1–2):51–60.
 32. Edmonds P, Cooney JJ. Lipids of *Pseudomonas aeruginosa* cells grown on hydrocarbons and on trypticase soy broth. *J Bacteriol.* 1969;98(1):16–22.
 33. Banat IM, Samarah N, Murad M, Horne R, Banerjee S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J Microbiol Biotechnol.* 1991;7(1):80–8.
 34. Guerra-Santos L, Kappeli O, Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol.*

- 1984;48(2):301–5.
35. MacElwee CG, Lee H, Trevors JT. Production of extracellular emulsifying agent by *Pseudomonas aeruginosa* UG1. *J Ind Microbiol.* 1990;5(1):25–31.
 36. Peypoux F, Michel G. Controlled biosynthesis of Val7- and Leu7-surfactins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992;36(4):515–7.
 37. Kim HS, Yoon BD, Choung DH, Oh HM, Katsuragi T, Tani Y. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;52(5):713–21.
 38. Hommel R, Stiiwer O, Stuber W, Haferburg D, Kleber H-P. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Touloopsis apicola*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1987;26:199–205.
 39. Abu-Ruwaida AS, Banat IM, Haditirto S, Salem A, Kadri M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization, and evaluation. *Acta Biotechnol.* 1991;11(4):315–24.
 40. Cunha CD, Do Rosário M, Rosado AS, Leite SGF. *Serratia* sp. SVGG16: A promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochem.* 2004;39(12):2277–82.
 41. Silva SNRL, Farias CBB, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2010;79(1):174–83. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>
 42. Oliveira FJS, Vazquez L, de Campos NP, de França FP. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Process Biochem.* 2009;44(4):383–9.
 43. Sheppard JD, Cooper DG. The effects of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. *J Chem Technol Biotechnol.* 1990;48(3):325–36.
 44. Shafiei Z, Hamid AA, Fooladi T, Yusoff WMW. Surface Active Components: Review. *Curr Res J Biol Sci.* 2014;6(2):89–95.
 45. Deshpande M, Daniels L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour Technol.* 1995;54(2):143–50.
 46. Santos DKF, Brandão YB, Rufino RD, Luna JM, Salgueiro AA, Santos VA, et al. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2014;3(3):48–57.
 47. Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Salgueiro AA, Sarubbo LA. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *J Pet Sci Eng.* 2013;105:43–50.
 48. Sarubbo LA, Farias CBB, Campos-Takaki GM. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr Microbiol.* 2007;54(1):68–73.
 49. Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour Technol.* 2008;99(1):195–9.
 50. Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit N V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front Microbiol.* 2014;5(DEC):1–18.
 51. Helmy Q, Kardena E, Funamizu N, Wisjnuprpto. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. *Int J*

- Biotechnol. 2011;12(1–2):66–86.
52. Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;102:202–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.008>
 53. Luna JM, Rufino RD, Jara AMAT, Brasileiro PPF, Sarubbo LA. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;480:413–8.
 54. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;53(5):495–508.
 55. De Almeida DG, Soares Da Silva R de CF, Luna JM, Rufino RD, Santos VA, Banat IM, et al. Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front Microbiol.* 2016;7(OCT):1–14.
 56. Biolin Scientific [Internet]. Demulsification | Surfactants & Emulsions. [citado 11 de Fevereiro de 2021]. Disponível em: <https://www.biolinscientific.com/surfactants-and-emulsions/demulsification>
 57. Dagbert C, Meylheuc T, Bellon-Fontaine MN. Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Electrochim Acta.* 2006;51(24):5221–7.
 58. Atlas RM. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. *J Chem Technol Biotechnol.* 1991;52(2):149–56.
 59. Chakrabarty AM. Genetically-manipulated microorganisms and their products in the oil service industries. *Trends Biotechnol.* 1985;3(2):32–9.
 60. Dave H, Ramakrishna C, Bhatt BD, Desai JD. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 1994;10(6):653–6.
 61. Miller RM. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ Health Perspect.* 1995;103(SUPPL. 1):59–62.
 62. Oberbremer A, Müller-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.* 1990;32(4):485–9.
 63. Foght JM, Gutnick DL, Westlake DWS. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(1):36–42.
 64. Jain DK, Lee H, Trevors JT. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J Ind Microbiol.* 1992;10(2):87–93.
 65. Mnif I, Ghribi D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. Vol. 96, *Journal of the science of food and agriculture*. 2016 Out.
 66. Daverey A, Pakshirajan K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. *Food Res Int* [Internet]. 2009;42(4):499–504. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.014>
 67. Manivasagan P, Sivasankar P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine

- actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014;37(5):783–97.
68. Meylheuc T, Renault M, Bellon-Fontaine MN. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2006;109(1–2):71–8.
 69. Sanchez L, Courteaux B, Hubert J, Kauffmann S, Renault JH, Clément C, et al. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol.* 2012;160(3):1630–41.
 70. Vatsa P, Sanchez L, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int J Mol Sci.* 2010;11(12):5095–108.
 71. Polman JK, Miller KS, Stoner DL, Breckenridge CR. Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants. *J Chem Technol Biotechnol.* 1994;61(1):11–7.
 72. Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J Hazard Mater.* 2001;85(1–2):111–25.
 73. Makkar R, Cameotra S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;58(4):428–34.
 74. Osada H. Bioprobes for Investigating Mammalian Cell Cycle Control. *J Antibiot (Tokyo).* 1998;51(11).
 75. Isoda H, Kitamoto D, Shinmoto H, Matsumura M, Nakahara T. Microbial Extracellular Glycolipid Induction of Differentiation and Inhibition of the Protein Kinase C Activity of Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997;61(4):609–14.
 76. Sotirova A, Spasova D, Vasileva-Tonkova E, Galabova D. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res [Internet].* 2009 [citado 12 de Março de 2022];164(3):297–303. Disponível em: www.elsevier.de/micres
 77. Thanomsab B, Pumeechockchai W, Limtrakul A, Arunrattiyakorn P, Petchleelaha W, Nitoda T, et al. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. *Bioresour Technol.* 2007;98(5):1149–53.
 78. Morita T, Kitagawa M, Yamamoto S, Suzuki M, Sogabe A, Imura T, et al. Activation of Fibroblast and Papilla Cells by Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids. *J Oleo Sci [Internet].* 2010;59(8):451–5. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jos/>
 79. Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa Á, et al. Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *rhodococcus* sp.: Evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir Artic.* 2010;26(11):8567–72.
 80. Saravanakumari P, Mani K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresour Technol [Internet].* 2010;101(22):8851–4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.104>
 81. Hagler M, Smith-Norowitz TA, Chice S, Wallner SR, Viterbo D, Mueller CM, et al. Sophorolipids Decrease IgE Production in U266 Cells by Downregulation of BSAP

- (Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):S263.
82. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114–22.
 83. Irie Y, O'Toole GA, Yuk MH. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;250(2):237–43.
 84. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(9):2125–33.
 85. Reid G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM(TM) as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy J*. 2000;10(5–6):415–9.
 86. Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA, Rodrigues LRM, Teixeira JAC, De Campos-Takaki GM. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Curr Microbiol*. 2011;62(5):1527–34.
 87. Diab A, Din SG El. Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil - contaminated vessels and enhancing the biodegradation. *African J Environ Sci ...* [Internet]. 2013;7(July):671–9. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajest/article/view/93908>
 88. Ferreira JS, Ferreira VLPC, Ferreira DC. Estudo da doença de Gaucher em Santa Catarina. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(1):5–11.
 89. Demczko M. Manual MSD Versão Saúde para a Família [Internet]. Doença de Gaucher. 2020 [citado 17 de Março de 2022]. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/problemas-de-saude-infantil/disturbios-metabolicos-hereditarios/doenca-de-gaucher>
 90. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, Van Weely S, Hrebíček M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*. 2000;355(9214):1481–5.
 91. Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, Priestman DA, Dwek RA, Butters TD, et al. Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24(2):275–90.
 92. Bruzaca DC. Dr. Caio Bruzaca, médico geneticista [Internet]. Terapia de redução de substratos: uma nova abordagem para as doenças lisossômicas. [citado 20 de Abril de 2022]. Disponível em: <https://bruzaca.com/tratamento-de-doencas-raras/terapia-de-reducao-de-substrato/>
 93. Cox TM. Future perspectives for glycolipid research in medicine. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2003;358(1433):967–73.

8. Anexos

Anexo 1 -Direitos de autor

- *Simple glycolipids of microbes: Chemistry, biological activity and metabolic engineering*

Ahmad Mohammad Abdel-Mawgoud, Gregory Stephanopoulos

Página 12

