

OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

LUCIANE MARIA COLLA*
JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA**

RESUMO

Biossurfactantes são compostos ativos em superfícies produzidos por microrganismos e que têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura, estabilidade, entre outros. O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, de-mulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na construção civil, em indústrias de alimentos, papel, metal, têxteis e farmacêuticas, apresentando seu maior potencial de aplicação na indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques, na recuperação melhorada de petróleo e em casos de biorremediação, como em derramamentos de óleos em ecossistemas aquáticos. Os microrganismos para a produção de biossurfactantes podem ser bactérias, fungos filamentosos ou leveduras, sendo os principais tipos de biossurfactantes produzidos, os glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros. Objetiva-se neste artigo revisar os principais aspectos envolvidos na obtenção dos biossurfactantes, os tipos de biossurfactantes produzidos e o potencial de aplicação dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: biossurfactantes, biorremediação, microrganismos.

ABSTRACT

Application and obtention of biosurfactants

Biosurfactants are biological surface-active compounds produced by microorganisms that have been gaining prominence in the last decades due to their advantages of biodegradability, low toxicity, production on renewable resources, functionality under extreme conditions of pH and temperature, stability and many others. These potential are based on their functional properties of emulsification, de-mulsification, separation, solubilization and surface tension reduction. It presents applications in many industries as food, cosmetic, pharmaceutical, metal, textile, paper and in the petrol industry, mainly in oil storage tank clean-up, enhanced

* Professora do Curso de Engenharia de Alimentos – UPF.

** Professor do Dep. de Química – FURG. E-mail: dqmjorge@furg.br

oil-recovery and oil pollution control. The biosurfactants-producing microorganisms can be bacteria, yeasts and molds, which can produce many kinds of biosurfactants, as glicolipids, phospholipids, liposaccharides, lipopeptides, fatty acids and neutral lipids. The purpose of this paper was to review the principal aspects involved in the obtention of biosurfactants, the biosurfactant-producing microorganisms and their potential of application.

KEY-WORDS: biosurfactants, bioremediation, microorganisms.

1 – INTRODUÇÃO

A utilização do petróleo como combustível e todas as etapas envolvidas no transporte, estocagem e distribuição do óleo cru e de seus derivados envolvem riscos de derrames acidentais, os quais têm sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas [10]. Estima-se que a cada ano 600.000 toneladas de petróleo bruto são derramadas em acidentes durante o transporte, rebentamentos de poços de petróleo, descargas ilegais de efluentes industriais e limpeza de tanques de navios no mar. O petróleo derramado flutua e alastra-se progressivamente, formando extensas manchas negras, denominadas marés negras, de efeitos altamente destruidores. Além dos seus efeitos imediatos, bem evidentes, há também os efeitos a longo prazo, com repercussões não menos graves. Quando as marés negras atingem as zonas costeiras colocam em risco a fauna e flora pela intoxicação de peixes, moluscos e alguns mamíferos, representando um perigo para o homem através da cadeia alimentar. Há também conseqüências econômicas e sociais, com prejuízos à atividade piscatória e pelo forte impacto negativo na atividade turística, já que os resíduos petrolíferos, de difícil remoção, impedem por muito tempo a utilização das praias [11, 37]. Exemplos recentes de acidentes com petróleo são o derrame de meio milhão de litros de combustível em janeiro de 2001 nas Ilhas Galápagos; o derrame de 4 milhões de litros de petróleo da Refinaria Getúlio Vargas no município de Araucária, no Paraná, em julho de 2000; e o vazamento de 1,3 milhões de litros de combustível em janeiro do mesmo ano na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. Essas evidências tornam urgente o desenvolvimento de tecnologias para diminuir o impacto ambiental ocasionado por esses acidentes, sendo a biorremediação um dos métodos mais estudados atualmente.

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza o metabolismo de microrganismos para eliminação rápida de poluentes presentes no ambiente ou a sua redução a níveis de concentração aceitáveis [18].

Entretanto, a biorremediação de substratos imiscíveis em água é limitada, devido à dificuldade da sua utilização pelos microrganismos [38]. Alguns microrganismos, porém, são capazes de produzir biossurfactantes, os quais apresentam propriedades emulsificantes, dispersantes e solubilizantes, podendo ocasionar a utilização de substratos hidrofóbicos e, por consequência, a detoxificação [3].

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e a capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas. Porém, ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos no mercado, principalmente devido ao seu alto custo [12, 23, 39]. A limpeza de locais marítimos e terrestres contaminados por derramamento de petróleo, remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos e córregos contaminados, assim como um aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios, são possíveis aplicações para os biossurfactantes [51].

Objetiva-se neste estudo revisar os principais aspectos referentes à obtenção e utilização dos biossurfactantes na biorremediação, em especial os microrganismos produtores e tipos de biossurfactantes obtidos.

2 – DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou biossurfactantes, produzidos por microrganismos. Surfactantes sintéticos são usados para uma vasta variedade de propósitos, como emulsificação, detergência, solubilização e umidificação. Atualmente, o mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano. Quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo. Entretanto, o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado nos últimos anos, devido às suas diversidades, características para o auxílio ambiental, a possibilidade de produção através de fermentações e suas potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde e indústrias de processamento de alimentos [24].

Os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras [9], sendo que as estruturas básicas são mostradas na Figura 1. Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água, e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade [1, 4, 7].

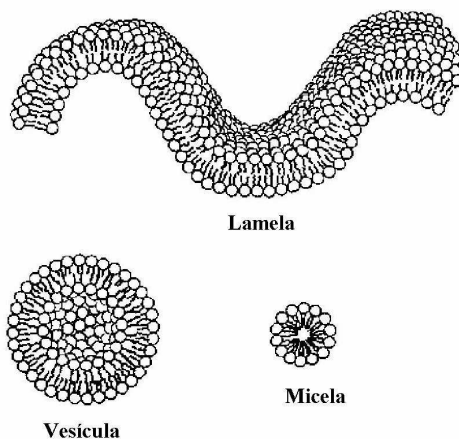


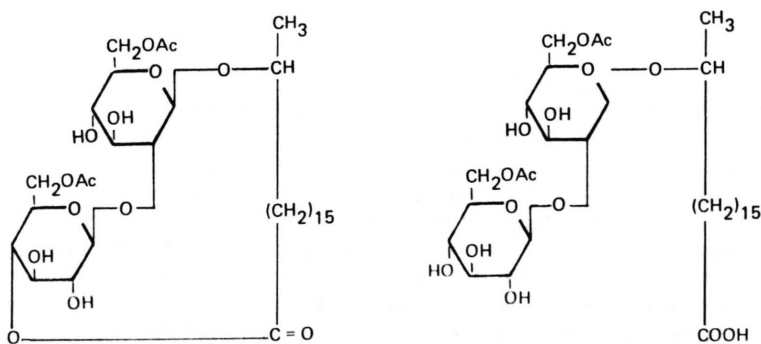
FIGURA 1 – Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.
FONTE: CHAMPION et al. [9]

Em comum com todas as moléculas que atuam em superfícies, os biossurfactantes contêm um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos. Os grupamentos lipofílicos podem ser uma proteína ou um peptídeo, apresentando partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos. Já os grupos hidrofílicos são ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos [7, 34]. Todos os biossurfactantes sob diferentes condições e em diferentes sistemas mostram habilidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de misturas óleo/água. Enquanto a maioria dos biossurfactantes não afeta a viscosidade do óleo, em alguns casos uma pequena mudança na viscosidade pode ser notada devido à utilização de hidrocarbonetos parafínicos, isoparafinas, cicloalcanos e hidrocarbonetos policíclicos [26].

Os principais tipos de biossurfactantes podem ser divididos em glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros [7, 26, 36]. Os glicolipídios dividem-se em trealose, soforolipídios ou ramícolipídios, em geral envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por microrganismos. HOLMBERG [17] define glicolipídios como hidróxi-ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica, enquadrando nessa classe somente os ramícolipídios e os soforolipídios. Classifica a trealose como um acil-poliol, cuja diferença para os glicolipídios é que o ácido graxo está ligado a um dissacarídeo através de uma ligação éster. Os fosfolipídios encontram-se presentes em todos os microrganismos, havendo poucos exemplos de produção extracelular, o mais notável é o biossurfactante produzido por *Corynebacterium lepus*. Já os lipossacarídios são emulsificantes extracelulares solúveis em água, de alto peso molecular, produzidos por bactérias degradadoras de hidrocarbonetos como *Acinetobacter calcoaceticus*. Os lipopeptídios são produzidos pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, sendo o biossurfactante mais utilizado a surfactina. Dentre os ácidos graxos e lipídios neutros, os principais são ácido ustilágico, ácidos corinomicólicos, ácidos lipoteicóico e proteínas hidrofóbicas.

Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, e apresentam grande diferença dos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica [48]. A composição e rendimento dos biossurfactantes dependem das características do fermentador, do pH do meio, da composição dos nutrientes, do substrato e da temperatura utilizada [36]. Na Figura 2 são mostradas as estruturas de alguns biossurfactantes.

(a)



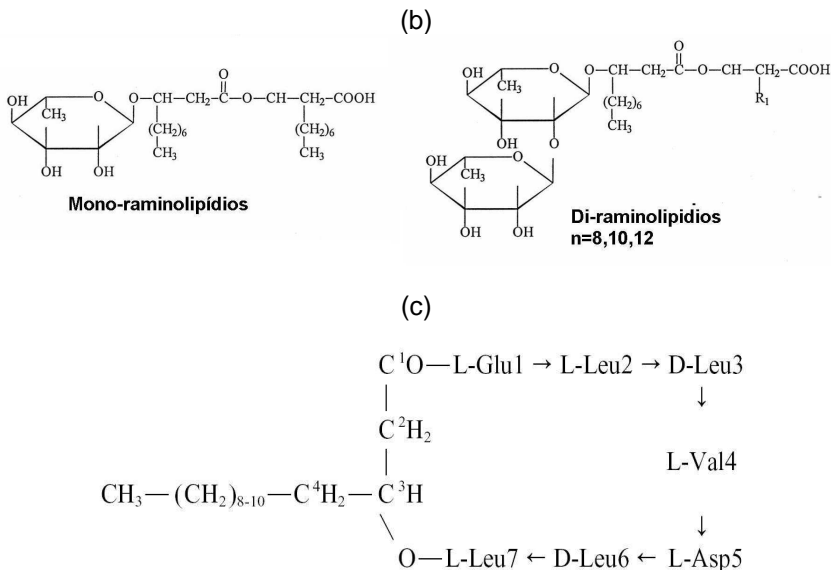


FIGURA 2 – Estruturas de biossurfactantes: (a) Soforolípidios; (b) Raminolípidios e (c) Surfactina.

FONTES: BOGNOLO [7], KOWALL et al. [27], SANDOVAL et al. [45].

3 – APLICAÇÕES DOS BIOSURFACTANTES

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de microrganismos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, de-mulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos [7, 14, 36]. Entretanto, os principais usos relacionam-se à indústria petrolífera, devido ao aumento da solubilidade dos componentes do petróleo. O potencial de recuperação de derivados de petróleo deve-se a sua utilização na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos [30].

Frações pesadas de óleos são mais viscosas e formam sedimentos sólidos no fundo dos tanques, sendo difícil a aspiração por meio de bombas. A lavagem requer o uso de solventes e a limpeza manual. Outro problema é a preocupação com o destino das águas de

lavagem e a perda econômica associada. Os métodos de limpeza baseiam-se na formação de emulsões concentradas de óleo em água através de agentes de superfície, com posterior bombeamento da emulsão formada, seguida da quebra desta emulsão e recolhimento do óleo. O bioemulsificante mais utilizado para este fim é o derivado da *Acinetobacter calcoaceticus*, denominado “emulsan”, cuja estrutura contém um ácido graxo e uma cadeia protéica ligada a um polissacarídeo [7, 36].

Biossurfactantes da classe raminolipídios (glicolipídio) produzidos a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* SB30 foram utilizados para a remoção de óleo de cascalhos no derrame de óleo do navio “Exxon Valdez”, no Alaska. Os resultados demonstraram que o bioemulsificante é de duas a três vezes mais efetivo na remoção do óleo do que a água. O aumento na concentração do bioemulsificante até 1% e na temperatura até 50°C, levou a uma significativa melhora na remoção do óleo. Já o tempo de contato demonstrou um valor ótimo em torno de 1 minuto. Além da melhoria quantitativa na remoção, o bioemulsificante não apresentou toxicidade e apresentou maior biodegradabilidade [2, 16].

Óleos lubrificantes de carros podem constituir um sério risco ao ambiente, uma vez que somente uma pequena parcela é reciclada e a maior parte é incinerada ou queimada. KOMA, HASUMI e YAMAMOTO et al. [25] estudaram a degradação de n-parafinas provenientes de óleo usado de carros a partir de microrganismos isolados do solo. A bactéria identificada como *Acinetobacter* sp. foi capaz de crescer em um meio mínimo contendo n-parafinas (0,1%p/v) após 96 horas de cultivo. Quando foi realizada a adição de óleo usado de carros houve a redução de 20% do mesmo, após 72 horas de cultivo.

A remoção de metais, que geralmente inclui a ação de ácidos, álcalis, complexantes, solventes solúveis em água, pode ser realizada pela ação de biossurfactantes. A surfactina, os raminolipídios e os soforolipídios são capazes de remover cobre e zinco de solos contaminados com hidrocarbonetos, devido ao caráter aniônico desses surfactantes. A surfactina apresentou uma remoção de cobre de 70% e de hidrocarbonetos de 50%, comparados com valores de 20 e 30% de remoção de cobre e hidrocarbonetos por um surfactante químico [35].

Os biossurfactantes também podem ser utilizados no processo de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (PHA) com quatro ou mais anéis aromáticos, já que a grande dificuldade no processo de biodegradação desses compostos reside em sua alta hidrofobicidade, baixa solubilidade em água e grande capacidade de adsorção em solos [3].

Um método promissor de recuperação do petróleo é a injeção de surfactantes em água ou vapor no poço não produtor (recuperação terciária). Apesar de tecnicamente fácil, o processo é economicamente questionável devido à larga quantidade de surfactante requerida [30]. Na recuperação melhorada de petróleo (MEOR), os microrganismos de um reservatório de petróleo são estimulados a produzir polímeros e biosurfactantes a fim de melhorar a recuperação do óleo pela diminuição da tensão interfacial na interface óleo-rocha, promovendo a movimentação do mesmo através dos poros das rochas [3].

4 – PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

A produção de moléculas com atividade de redução da tensão superficial ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso, o que impede a sua oxidação e assimilação. As vias dessas moléculas nos microrganismos envolvem primeiramente a formação das moléculas que irão constituir as porções hidrofóbicas e hidrofílicas do mesmo, estando envolvidos os mecanismos de biossíntese de ácidos graxos, carboidratos e derivados. A assimilação de n-alcenos pode ocorrer através de três mecanismos: (a) assimilação de hidrocarbonetos dissolvidos no meio, geralmente cadeias carbonadas curtas (<10 carbonos) que apresentam solubilidade limitada em meio aquoso; (b) mecanismo de contato direto, no qual ocorre a formação de agregados compostos de células, gotas de hidrocarbonetos e ar, ocasionando um aumento na lipoficidade da superfície celular induzida pelo contato com o hidrocarboneto, que é absorvido pela célula através das camadas lipofílicas do envelope celular; ou (c) assimilação de hidrocarbonetos emulsificados, onde a partir do contato com a célula, o substrato é convertido em pequenas gotículas, ocasionando uma pseudo-solubilização através de agentes extracelulares produzidos pelas células [26].

Após a entrada na célula, os hidrocarbonetos são oxidados a álcoois, depois a aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, através da oxidação terminal. Cadeias menores de ácidos graxos também podem ser obtidas pelo ataque em porções subterminais, obtendo-se álcoois secundários e cetonas, que após uma clivagem levam à formação de ácidos graxos de cadeias curtas. Apesar disto, a incorporação de hidrocarbonetos geralmente leva à presença nas moléculas de biosurfactantes de ácidos graxos de cadeia carbônica de mesmo número de carbonos que a fornecida pelo substrato. Esses ácidos

graxos podem ainda sofrer alongação, dessaturação ou hidroxilação das cadeias carbônicas, ou serem oxidados até acetil-CoA ou propionil-CoA, via β -oxidação ou ainda α e ω -oxidação. No caso de microrganismos que acumulam lipídios em grandes quantidades (>25% do peso seco da célula), os ácidos graxos formados a partir da incorporação de hidrocarbonetos ou ácidos graxos no meio de cultivo podem ser esterificados ao glicerol para formarem mono, di e triacilgliceróis, a forma mais comum de reserva de lipídios em células eucarióticas [26].

Em cultivos em batelada, o acúmulo de lipídios é favorecido quando no meio há um excesso da fonte de carbono sobre outros nutrientes limitantes, sendo que a curva de crescimento, a curva de produção do biossurfactante e a curva de consumo do nutriente limitante tem o aspecto do gráfico mostrado na Figura 3. Há uma fase inicial de crescimento balanceado durante a qual todos os nutrientes são igualmente absorvidos. Os níveis lipídicos nessa fase mantêm-se inalterados e são modestos. Quando inicia a limitação de nutrientes, a velocidade de crescimento decresce, mas o carbono continua sendo transportado para o interior das células e utilizado para a biossíntese de lipídios, sendo que os produtos finais formados nessas circunstâncias podem ser lipídios, polissacarídeos, polímeros de estocagem como o poli-hidroxitbutirato ou antibióticos. Nutrientes limitantes que podem levar a essas condições são o nitrogênio, magnésio, ferro e fósforo. Outras condições de crescimento importantes são o pH, atividade de água, concentração de O_2 , temperatura e salinidade [26].

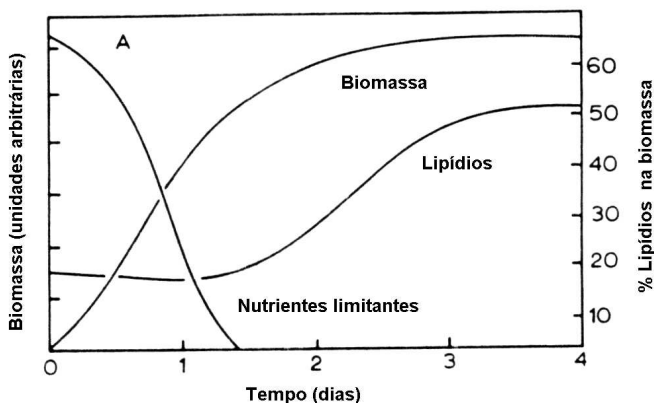


FIGURA 3 – Curva de crescimento de microrganismo para a produção de biossurfactante sob limitação de nutriente.

FONTE: KOSARIC et al. [26].

Há uma grande quantidade de microrganismos com a capacidade de degradar e/ou assimilar hidrocarbonetos. Desse número de microrganismos, alguns também são capazes de emulsificar esses hidrocarbonetos durante o processo da degradação do substrato. Microrganismos que assimilam petróleo ou derivados são comumente encontrados em locais onde ocorreu alguma contaminação, ou em áreas que historicamente têm sido expostas a algum tipo de hidrocarboneto [44].

Em um estudo comparativo de várias espécies de microrganismos, os mais efetivos na degradação de uma mistura de hidrocarbonetos como substrato foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp, *Sporobolomyces* sp, *Rhodotorula glutinis*, *Candida* sp e *Penicillium* sp. Os alcanos normais mostraram-se mais suscetíveis à degradação por microrganismos quando o comprimento da cadeia carbônica aumenta de 10 para até 20 carbonos. Os fungos demonstraram uma pequena correlação entre o comprimento de cadeia normal dos alcanos e a sua suscetibilidade à biodegradação. Outros hidrocarbonetos mais complexos, como cumenos, naftalenos, fenantrenos, pristanos, 1,2 benzantraceno, pirilenos e pirenos, também foram degradados por alguns microrganismos [53]. A Tabela 1 apresenta os microrganismos segundo o tipo de biossurfactantes produzidos.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de degradar vários hidrocarbonetos presentes em solos contaminados com petróleo, principalmente n-alcanos [4, 18, 47]. RIDGWAY, SAFARIK e PHIPPS *et al.* [41] isolaram cerca de 300 bactérias degradativas de gasolina de um aquífero costeiro contaminado com gasolina. A identificação de 244 das bactérias isoladas revelou especialmente os gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia* e *Micrococcus*, sendo que *Pseudomonas* corresponderam a 86,9% das bactérias identificadas, e a *Pseudomonas aeruginosa* a mais encontrada. BARATHI e VASUDEVAN [4] utilizaram uma cepa de *Pseudomonas fluorescens* isolada de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e observaram a produção de biossurfactante durante a degradação de n-alcanos, principalmente o hexadecano, seguido do hexano, decano, querosene e óleo cru. A produção do biossurfactante (0,58 g/L em 24 horas) foi observada durante o período de crescimento do microrganismo, com uma tensão superficial de 35mN/m, apresentando atividade emulsificante em substratos como tolueno, hexano, óleo de girassol e querosene, além de hidrocarbonetos aromáticos como o naftaleno e fenantreno. A biodegradação de pireno e fenantreno em solos por *Pseudomonas aeruginosa* também foi reportada por HWANG e

CUTRIGH [19]. A produção de um raminolípido no meio extracelular foi observada por WU e JU [54], sendo observada na deficiência de nitrogênio durante a fase estacionária de crescimento.

TABELA 1 – Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

Biossurfactante	Microrganismo
Glicolípídios	Micolatos de trealose <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i>
	Ésteres de trealose <i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora</i> sp. <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Micolados de mono-di e trissacarídios <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter</i> sp.
	Raminolípídios <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Torulopsis bombicola</i>
	Soforolípídios <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Candida</i> sp.
Fosfolípídios e ácidos graxos	<i>Candida</i> sp. Fosfolípídios e ácidos graxos <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.
	Ácidos graxos <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Bacillus brevis</i>
Lipopeptídios	Lipopeptídios e lipoproteínas <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	Surfactina <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Poliméricos	Lipopolissacarídios <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Heteropolissacarídios <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A1

Fonte: Adaptado de ANNA [1]

HUY, JIN e AMADA et al. [18] isolaram quatro cepas de bactérias em solos contaminados com petróleo no Vietnã, sendo três identificadas como *Pseudomonas* sp. e uma como *Acinetobacter* sp., esta com 95% de biodegradação de óleo cru (5%, v/v) contendo n-alcanos, n-alcenos e um composto heterocíclico (dibenzotiofeno) presente em pequenas quantidades, sendo este biodegradado com pouca eficiência. O biossurfactante produzido pela *Acinetobacter* sp. foi identificado como um polissacarídio, enquanto o produzido pelas *Pseudomonas* sp., como um glicolípido.

Cepas de *Bacillus* têm sido indicadas pela produção do biossurfactante denominado surfactina, o qual consiste de um

lipopeptídio cíclico consistindo de um ácido graxo de 14 a 15 carbonos ligado a um peptídio com 7 resíduos de aminoácidos. A surfactina é produzida por vários *Bacillus*, nos quais a fonte de carbono é um carboidrato e não um hidrocarboneto ou óleo vegetal. A produção de um biossurfactante denominado C9-BS utilizando o *Bacillus subtilis* C9 foi estudada utilizando como fontes de carbono a glicose, óleo de soja ou n-hexadecano. Um elevado rendimento de produção do C9-BS foi obtido com glicose como fonte de carbono, enquanto a utilização de hidrocarbonetos como substrato inibiu a produção do biossurfactante [23]. Similarmente, FOX e BALA [15] obtiveram elevados rendimentos de produção de biossurfactante utilizando o *Bacillus subtilis* a partir de um meio rico em amido, simulando os resíduos de indústrias de processamento de batatas. Os resultados demonstraram que o *B. subtilis* foi capaz de degradar substratos para a produção do biossurfactante, sendo que as tensões superficiais passaram de $71,3 \pm 0,1$ para $28,3 \pm 0,3$ mN/m no meio simulado, e para $27,5 \pm 0,3$ mN/m em um meio contendo amido comercial e sais minerais. A produção do biossurfactante pelo *Bacillus* sp. provavelmente ocorre devido a mecanismos de proteção da célula ao ataque de outros microrganismos. A surfactina é considerada como um CLPBS (cyclic lipopeptide biosurfactants), que possui diversas atividades biológicas como antibacteriano e antiviral e na estimulação da atividade dos macrófagos [52]. Os CLPBS interagem com os fosfolípidios da bicamada lipídica apresentando a função de transporte de cátions como o Ca^{+2} nas membranas. Diminuem a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, em uma concentração micelar crítica de $7 \cdot 10^{-5}$ M [34].

Nocardia amarae, um actinomiceto, é responsável pela formação de espumas em plantas de tratamento de lodo ativado, atividade esta atribuída à presença de substâncias hidrofóbicas na parede celular destas leveduras, devido à produção de glicolípídios, apresentando propriedades de emulsificação em mistura com hexadecano [22].

Dentre 20 bactérias isoladas de um solo poluído na Nigéria e 10 leveduras isoladas de um solo não poluído no Campus da Universidade de Calabar (Nigéria), a *Candida tropicalis* foi o microrganismo que apresentou maior eficiência na degradação de óleo cru, quando comparado a duas bactérias, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus*. A levedura degradou 68,9% do óleo cru, enquanto as bactérias *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus* degradaram 51,5% e 45,5%, respectivamente, em 16 dias de incubação [20].

MIYAZAKI, MIYAGAWA e SUGIYAMA et al. [32] avaliaram 96 leveduras quanto à produção de trealose. Dentre estas, *Filobasidium*

floriforme foi a que apresentou os melhores resultados de produção de trealose, de 10 mg/ml de trealose (peso seco) ou 20% de trealose a partir do crescimento em meio com 100 mg/ml de glicose em 24 horas de cultivo.

Em determinados processos biotecnológicos industriais há a obtenção de moléculas com propriedades emulsificantes sem que o objetivo do processo seja este. O fungo filamentosso *Curvularia lunata*, utilizado na fabricação de hidrocortizonas, foi estudado por PARASZKIEWICZ, KANWAL e PDLUGONSKI et al. [38] pela produção de um composto extracelular, formado por uma proteína complexa (25%) e um polissacarídeo (48%), capaz de estabilizar emulsões óleo em água, quando crescendo em um meio contendo compostos hidrofóbicos como cortexolona, antraceno e fenantreno. A maior concentração do bioemulsificante (2,6 g/L) foi obtida na fase estacionária de crescimento, após 47 h de cultivo, sendo que o início da fase estacionária ocorreu em 18 h de cultivo. Após o cultivo, o bioemulsificante foi extraído do meio de cultivo e utilizado para os testes de bioemulsificação, apresentando máximas atividades de emulsificação com querosene, óleos vegetais e minerais. Exemplo semelhante foi a obtenção de um bioemulsificante a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, estudado por BARRIGA, COOPER e IDZIAK et al. [5], com potencial de utilização na indústria alimentícia e de cosméticos, sendo a levedura um resíduo de cervejarias e vinícolas. O bioemulsificante é uma manoproteína solúvel em água e facilmente extraída da parede celular da levedura, sendo composta principalmente por proteína e carboidrato. No estudo, a manoproteína foi separada em frações, sendo atribuído o poder emulsificante à fração proteica. Na tabela 2 são apresentados estudos recentes da produção de biossurfactantes, incluindo o microrganismo produtor, o substrato utilizado e o biossurfactante produzido, quando realizada a identificação.

Em muitos casos, a biorremediação é realizada pelo uso de microrganismos sem que haja produção de biossurfactantes. A biorremediação *in situ* tem sido utilizada em solos e sedimentos contaminados com PCBs (compostos policlorados), através do uso de uma diversidade de fungos e bactérias. RUIZ-AGUILAR GRACIELA, SANCHEZ e VAZQUEZU et al. [43] utilizaram os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Lentinus edodes* na biorremediação de uma mistura de PCBs nas concentrações iniciais de 300 a 6000 mg/L, tendo sido utilizados surfactantes químicos na emulsificação dos PCBs no meio de cultivo, sendo o Tween 80 o que apresentou melhores resultados de emulsificação, não apresentando efeito inibitório no crescimento dos fungos. A degradação dos PCBs foi

de 29 a 70%, 34 a 73% e de 0 a 33% para *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinus edodes*, respectivamente, em 10 dias de incubação.

TABELA 2 – Estudos recentes da produção de biossurfactantes por microrganismos em diversos substratos.

Referência	Microrganismo	Substrato	Biossurfactante
MARCHI; CARVALHO; DURRANT et al. [31]	<i>Bacillus</i> <i>Enterobacter</i>	Óleos vegetais, canola; diesel; querosene; tolueno e vaselina	*
HWANG; CUTRIGH [19]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pireno e fenantreno	Raminolipídio
SCHMID; KOLLMER; WITHOLT et al. [47]	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	n-decano	*
IJAH [20]	<i>Serratia marcescens</i> <i>Acinetobacter acetoaceticus</i> <i>Candida tropicalis</i>	Óleo cru (C20-C28) Óleo cru (C22-C30) Óleo cru (C12-C32)	*
RICHTER; WILLEY; SÜBMUTH et al. [40]	<i>Streptomyces tendae</i> Tü 90118C	*	Estreptofactina (lipopeptídio)
WU; JU [54]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n-hexadecano (limitação de nitrogênio)	Raminolipídio
DAVIS; LYNCH; VARLEY [12]	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Limitação nitrogênio Anaerobiose	Surfactina
FOX; BALA [15]	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Meio contendo amido	Surfactina
KIM; YOON ; LEE et al. [23]	<i>Bacillus subtilis</i> C9	*	C9-BS Surfactina
BARATHI; VASUDEVAN [4]	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Meio mínimo + óleo cru, querosene, hexadecano, decano ou hexano	*
HUY; JIN; AMADA et al. [18]	<i>Pseudomonas sp</i> <i>Acinetobacter sp</i>	Óleo cru, n-alcenos, n-alcenos, dibenzotiofeno, Meio com água do mar	Glicolipídio Polissacarídeo
KUYUKINA; IVSHINA; PHILP et al. [28]	<i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 231	n-hexadecano	*
MIYAZAKI; MIYAGAWA; SUGIYAMA et al. [32]	<i>Filobasidium foliforme</i>	Glicose	Trealose
KIM; LIM; LEE et al. [24]	<i>Nocardia sp</i> L-417	Hexadecano	*
BICCA; FLECK; AYUB et al. [6]	<i>Rhodococcus ruber</i> e <i>R. erythropolis</i>	Diesel 1%	*

* não-identificado

Outra classe de compostos potencialmente tóxicos são os PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), componentes do petróleo, pixe e carvão, mas formados principalmente a partir da combustão incompleta. SARASWATHY e HALLBERG [46] estudaram a utilização do pireno como única fonte de carbono por cinco linhagens de fungos identificados como *Trichoderma harzianum*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium funiculosum* e *Penicillium terrestre*. Os melhores resultados obtidos foram com o *Penicillium terrestre*, com degradação de 75% de 50 mg/L e 67% de 100 mg/L do pireno, a 22°C durante 28 dias de incubação. ZHENG e OBBARD [55] estudaram os principais fatores que afetam a oxidação dos PAH pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Outros exemplos de casos de biorremediação são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3 – Utilização de microrganismos em casos de biorremediação sem a produção de biossurfactantes.

Microrganismo	Substrato	Referência
<i>Pleurotus</i> sp.	Compostos fenólicos (69-76%)	TSIOULPAS et al. [50]
Cogumelos (<i>Aleurodiscus</i> , <i>Ceriporia</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i>)	Dioxina (20%)	MORI; KONDO [33]
<i>Resinicium bicolor</i>	Reciclagem de borracha	BREDBERG et al. [8]
<i>Trametes versicolor</i> MTCC-138 <i>Heterobasidium annosum</i> MTCC-146 <i>Phellinus pini</i> RAB-83-19 <i>Pleurotus ostreatus</i> MTCC-142 <i>Phlebia radiata</i>	Triterpenóide (11 a 15,7%)	SINGH et al. [49]
<i>Trametes trogii</i>	Nitrobenzeno e antraceno (90%)	LEVEN et al. [29]
<i>Fusarium solani</i> e <i>Rhodotorula glutinis</i>	Pireno (32 e 37%)	ROMERO et al. [42]
Cogumelos	PCBs	RUIZ-AGUILAR GRACIELA, SANCHEZ e VAZQUEZU et al. [43]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PAH (86%)	EGGEN [13]

A produção comercial de biossurfactantes com a finalidade de substituição de surfactantes químicos para a utilização em casos de biorremediação ou outras aplicações é um objetivo a ser alcançado a longo prazo. Para tanto, devem ser desenvolvidas tecnologias que possibilitem a produção de biossurfactantes com baixos custos. Nesse contexto, esperamos que esta revisão contribua para fornecer informações sobre as principais aplicações dos biossurfactantes,

principalmente para a indústria do petróleo, bem como acerca da obtenção destes compostos através dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

1. ANNA, L. M. M. S. *Produção de biossurfactantes do tipo raminolipídio por Pseudomonas sp.* Rio de Janeiro, 2000. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
2. ANNA, L. M. M. S.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; PEREIRA, N. J.; FREIRE, D. M. G. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolada de ambientes de petróleo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 13. Teresópolis, 2000.
3. BANAT, I.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 53, p. 495-508, 2000.
4. BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, n. 26, p. 413-416, 2001.
5. BARRIGA, J. A. T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, E. S.; CAMERON, D. R. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 25, p. 96-102, 1999.
6. BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, n. 30, p. 231-236, 1999.
7. BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hidrocarbons. *Colloids and Surfaces*, n. 152, p. 41-52, 1999.
8. BREDBERG, K.; ANDERSSON, B. E.; LANDFORS, E.; HOLST, O. Microbial detoxification of waste rubber material by wood-rotting fungi. *Bioresource Technology*, n. 83, p. 221-224, 2002.
9. CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science*, n. 170, p. 569-574, 1995.
10. CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brazil. *Environmental Pollution*, n. 108, p. 291-295, 2000.
11. DAMAS, A.; ANTUNES, C.; SILVA, N.; ALVES, S. *As marés negras e os seus efeitos tóxicos na fauna marinha*. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 1999/2000.
12. DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 25, p. 322-329, 1999.
13. EGGEN, T. Application of fungal substratum commercial mushroom production – *Pleurotus ostreatus* – for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, n. 44, p. 117-126, 1999.
14. FIECHTER, A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. *Trends in Food Science and Technology*, n. 31, p. 283-293, 1992.

15. FOX, S.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, n. 75, p. 235-240, 2000.
16. HARVEY, S.; ELASHVILLI, I.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. *Biotechnology*, n. 8, p. 228-230, 1990.
17. HOLMBERG, K. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, n. 6, p. 148-159, 2001.
18. HUY, N. Q.; JIN, S.; AMADA, K.; HARUKI, M.; HUU, N.; HANG, D. T.; HÁ, D. T. C.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, n. 1, p. 100-102, 1999.
19. HWANG, S.; CUTRIGH, T.J. Bio degradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere* 47, 891-899, 2002.
20. IJAH, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*, n. 18, p. 293-299, 1988.
21. ISHIGAMI, Y.; SUSUKI, S. Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes. *Progress in Organic Coatings*, n. 31, p. 51-61, 1997.
22. IWAHORI, K.; TOKUTOMI, T.; MIYATA, N.; FUJITA, M. Formation of stable foam by the cells and culture supernatant of *Gordonia (Nocardia) amarae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, n. 92, v. 1, p. 77-79, 2001.
23. KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T. TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, n. 1, p. p. 41-46, 1997.
24. KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnology Applied Biochemistry*, n. 31, p. 249-253, 2000.
25. KOMA, D.; HASUMI, F.; YAMAMOTO, S.; OHTA, T.; CHUNG, S. Y.; KUBO, M. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 1, p. 94-96, 2001.
26. KOSARIC, N., CAIRNS, W. L. *Biosurfactants and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 21-46 e 47-88.
27. KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T. FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science*, n. 204, p. 1-8, 1998.
28. KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*, n. 46, p. 149-156, 2001.
29. LEVEN, L.; VIALE, A.; FORCHIASSIN, A. Degradation of organic pollutants by the white-rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. In press.
30. LIMA, A. S. *Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por Saccharomyces lipolytica*. Campinas, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
31. MARCHI, D. D.; CARVALHO, D. F.; DURRANT, L. R. Produção de biossurfactantes bacterianos em óleos vegetais e derivados de petróleo. In: REUNIÃO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO MEIO AMBIENTE, 2. Florianópolis, 1998.

32. MIYAZAKI, J.; MIYAGAWA, K.I.; SUGIYAMA, Y. Trehalose accumulation by a basidiomycotinous yeast, *Filobasidium floriforme*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 81, n. 4, p. 315-319, 1996.
33. MORI, T.; KONDO, R. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability. *FEMS Microbiology Letters*, 200. In press.
34. MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, T.; IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, n. 175, p. 6459-6466, 1993.
35. MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. *Environmental Progress*, n. 18, p. 31-35, 1999.
36. MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, n. 60, p. 371-380, 2001.
37. NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. P. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochemistry*, n. 37, p. 1135-1141, 2002.
38. PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*, n. 92, p. 287-294, 2002.
39. PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* – an Antarctic strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, n. 1, p.137-139, Jan. 1997.
40. RICHTER, M.; WILLEY, J. M.; SÜBMUTH, R.; JUNG, G.; FIEDLER, H. P. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tul 901/8c. *FEMS Microbiology Letters*, p. 163-165, 1998.
41. RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied Environmental Microbiology*, n. 56, p. 3565-3575.
42. ROMERO, M. C.; SALVIOLI, M. L.; CAZAU, M. C.; ARAMBARRI, A. M. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution*, n. 117, p. 159-163, 2002.
43. RUIZ-AGUILAR GRACIELA, M. L.; SANCHEZ, J. M. F.; VAZQUEZU, R. R.; POGGI-VARALDO, H. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research*, 2001. In press.
44. SAMPAIO, R. M. *Estudo da produção de bioemulsificante de Saccharomyces lipolytica por fermentação em óleo-diesel comercial*. Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
45. SANDOVAL, J. C. M.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of Chromatography*, n. A-864, p. 211-220, 1999.
46. SARASWATHY, A.; HALLBERG, R. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters*, p. 210-227, 2002.
47. SCHMID, A.; KOLLMER, A.; WITHOLT, B. Effects of biosurfactant and emulsification on two-liquid phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and cell-free emulsions containing n-decane. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 22, p. 487-493, 1998.
48. SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. *Indian Journal of Microbiology*, n. 33, p. 163-184, 1995.

49. SINGH, A.; SHARMA, O. P.; BHAT, T. K.; VATS, S. K.; OJHA, S. Fungal degradation of lantadene A, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxin of lantana plant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, n. 47, p. 239-242, 2001.
50. TSIOLPAS, A.; DIMOU, D.; ICONOMOU, D.; AGGELIS, G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, n. 84, p. 251-257, 2002.
51. VAN DYKE, M. I.; H. LEE; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. *Biotechnology Advances*, n. 9, p. 241-252, 1991.
52. VOLLENBROICH, D; OZEL, M; VATER, J; KAMP, R. M; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, n. 25, p. 289-297, 1997.
53. WALKER, J. D.; AUSTIN, H. F.; COLWELL, R. R. Utilization of mixed hydrocarbon substrate by petroleum-degrading microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 21, n. 1, p. 27-39, 1975.
54. WU, J.; JU, L. K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, n. 59, p. 193-202, 1998.
55. ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 31, p. 3-9, 2002.

