



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

ITALO WALDIMIRO LIMA DE FRANÇA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E APLICABILIDADE DE BIOSSURFACTANTE
BACTERIANO PRODUZIDO POR CEPA ISOLADA DE MANGUEZAL CEARENSE**

FORTALEZA

2014

ÍTALO WALDIMIRO LIMA DE FRANÇA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E APLICABILIDADE DE BIOSSURFACTANTE
BACTERIANO PRODUZIDO POR CEPA ISOLADA DE MANGUEZAL
CEARENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- F881e França, Ítalo Waldimiro Lima de.
 Estudo da produção e aplicabilidade de biossurfactante bacteriano produzido por Cepa isolada de manguezal cearense / Ítalo Waldimiro Lima de França. – 2014.
 137 f. : il. color. enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
 Orientação: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana.
 Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Engenharia Química. 2. Toxicidade. 3. Biorremediação. I. Título.

ÍTALO WALDIMIRO LIMA DE FRANÇA

ESTUDO DA PRODUÇÃO E APLICABILIDADE DE BIOSURFACTANTE
BACTERIANO PRODUZIDO POR CEPA ISOLADO DE MANGUEZAL
CEARENSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química do Departamento
de Engenharia Química da Universidade
Federal do Ceará, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química. Área de
concentração: Processos Biotecnológicos
Orientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista
Sant'Ana. Co-orientadora: Profª. Dra.
Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Aprovada em 03 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Hosiberto Batista da Sant'Ana
Prof. Dr. Hosiberto Batista Sant'Ana (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Luciana Rocha Barros Gonçalves
Profª. Drª. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Gorete Ribeiro de Macedo
Profª. Drª. Gorete Ribeiro de Macedo
Examinadora Externa DEQ/UFRN

Vânia Maria Maciel Melo
Profª. Drª. Vânia Maria Maciel Melo
Examinadora Externa DB/UFC

A Deus, por sempre ter me dado forças e me
guitar para a luz.

À minha mãe e meus irmãos, pelo amor
incondicional.

AGRADECIMENTO

A Deus, por sempre ter me dado forças, por sempre ser meu guia em minhas decisões e nunca desaninar com um fracasso momentâneo. Sem Ele tudo teria se resumido à nada.

À minha mãe, Maria das Graças, pelo seu amor, garra e força, por tanto ter contribuído e se esforçado para a realização dos meus sonhos. Por ter acreditado em mim em todos os momentos em que o mundo parecia dizer não. Por ser o maior exemplo de vida que eu conheço. Por ser mãe, amiga, conselheira, guia e TUDO na minha vida.

Aos meus irmãos Assis e Victor, pela amizade, confiança, conselhos, e incentivos. Pelo amor que sempre nos une e se fortalece a cada dia.

À minha tia, Aracy, por todo o suporte, incentivo conselhos fornecidos. À minha prima, Grazielly, por todas as conversas, passeios, risadas e momentos descontraídos, por sempre conseguir arrancar um sorriso do meu rosto, até quando as circunstâncias não permitem. Aos meus familiares.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química da UFC (DEQ/UFC), por todo o conhecimento fornecido.

Ao Prof. Hosiberto Sant'Ana, por todo o suporte, confiança no meu trabalho e conselhos. Obrigado pelo aceite da orientação e por todas as dicas que foram fundamentais para a construção deste trabalho. Obrigado pela paciência. Seu profissionalismo e dedicação são bastante admirados por mim.

À Profa. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela confiança no meu trabalho. Por ter me mostrado a paixão pela pesquisa. Por ter me oferecido algo pelo qual eu me encontrei e tenho total prazer em fazê-lo: pesquisar. Por acreditar no meu potencial, por todos os ensinamentos, por todas as aulas, por todas as dúvidas sanadas, pela direção, por mostrar o erro e o caminho a seguir. Por todo o crescimento profissional durante esses 5 anos de orientação. Pelo exemplo de pessoa, engenheira química, professora e pesquisadora. Meu carinho, admiração e gratidão.

À Profa. Valderez Rocha, sempre disponível para tirar alguma, resolver algum problema ou dar algum conselho para a pesquisa. Tem minha imensa admiração e agradecimentos.

À Profa. Vânia Melo, do Departamento de Biologia, pelo micro-organismo cedido e pela disponibilização do laboratório todas as vezes que precisei.

Ao Professor Ronaldo Nascimento, do Departamento de Química, pela disponibilização do equipamento do Espectrofometria de absorção atômica. Agradecimentos a todos do LANAGUA, especialmente a Nathaniela.

Aos meus colegas de GPBIO. Por todos os momentos de auxílio ou mesmos os de descontração. GPBIO pra mim, não é só meu local de trabalho, é minha segunda família. São as pessoas que no meu dia-a-dia, eu sei que estarão lá seja para um momento de descontração ou mesmo pra dividir um problema. Minha família de coração que tem me acolhido calorosamente pelos últimos 6 anos. Agradecimentos especiais aos alunos de iniciação científica que tanto me auxiliaram durante este e

Alexandre, Andrea, Brenda e Suyanne.

Aos colegas de turma de mestrado: Micael, Rosy, Kenia, Gaby, Pedro e Daniel. Ao Tiago, por todos os conselhos, risadas, conversas e ajudas no HPLC.

Aos amigos de curso e Engenheiros Químicos: Mariana, Juliana, Oleon, Salomão, Raphael, Ramon, Ana e Pedro Felipe. Apesar dos caminhos da vida nos guiar a locais distintos, a nossa amizade sempre será real e concreta.

Ao meu amigo Elmo, por nossas incansáveis conversas acerca de copos meio cheios ou meio vazios. Por todas as risadas, conversas, inúmeros conselhos e companhia. Sem os seus empurrõezinhos, a caminhada nunca teria sido tão longe. Os anos se passam, mas a nossa amizade nunca enfraquece, que continue assim pelo resto de nossas vidas. Sua amizade é essencial pra mim. Aos meus amigos: Thiago, Talita, Fernanda, David e Martina.

É um tanto quanto complicado resumir em palavras o quanto eu tenho a agradecer a todos que diretamente, ou mesmo indiretamente, contribuiram para esta conquisata. A todos que me ajudaram a crescer pessoal e profissionalmente, vocês contribuiram pra realização de um sonho.

A ANP/PETROBRÁS pela bolsa de pesquisa fomentada.

“Nós aceitamos o amor que achamos merecer...”

Stephen Chbosky

RESUMO

A grande procura por surfactantes químicos no mercado tem aumentado o interesse em bio surfactantes, substâncias biodegradáveis produzidas por bactérias, leveduras e fungos. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar a produção de bio surfactante por cepa isolada de manguezal cearense, bem como avaliar as propriedades funcionais e aplicabilidade do produto formado. Os resultados mostraram que o bio surfactante produzido pela cepa ICA56, em meio mineral, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN.m⁻¹ e interfacial de um sistema água/gasolina de 15 para 3 mN.m⁻¹, mostrando sua eficiência como tensoativo. O bio surfactante produzido foi capaz de produzir emulsão estável em algumas fontes hidrofóbicas, tais como, óleo de motor, óleo de soja, hexano e querosene. As propriedades emulsificante e tensoativas do bioproduto formado no cultivo da cepa ICA56 mostraram-se estáveis frente às variações de pH, temperatura e concentração salina, mostrando indícios de sua ampla aplicabilidade. Outro resultado que comprova a eficiência do bio surfactante produzido é a sua concentração micelar crítica em torno de 25 mg.L⁻¹. O bio surfactante produzido foi capaz de remover hidrocarbonetos e metais pesados em sistemas que simulavam ambientes contaminados, apresentando eficiência, quando comparado aos surfactantes químicos. Apesar da eficiência das propriedades funcionais e aplicabilidade do bio surfactante, a produção em meio mineral era em torno de 200 mg.L⁻¹, sendo esta uma concentração razoável. Foram avaliadas duas alternativas para o aumento da produção de bio surfactante: a influência transferência de oxigênio em biorreator de bancada e a utilização de substratos não convencionais. A variação da agitação e aeração em biorreator de bancada não apresentou um resultado tão significativo, mostrando que a condição operacional de 200 rpm de agitação e 1 L.min⁻¹ de aeração foi a melhor, dentre as avaliadas, para a produção de bio surfactante. Já a utilização de substratos não convencionais mostrou-se como uma melhor alternativa para aumentar a produção, pois além de reduzir custos no processo, foram observados maiores rendimentos do que no meio sintético. Substratos como óleo de girassol e glicerol são apresentados como potenciais fontes de carbono para produção de bio surfactante pela cepa ICA56, obtendo concentrações de 870 mg.L⁻¹ e 1420 mg.L⁻¹ do produto de interesse, na sua forma bruta, respectivamente.

Palavras-chave: bio surfactante, bioremediação, toxicidade, substratos de baixo custo.

ABSTRACT

The high demand for chemical surfactants in the worldwide market has increased the interest on biosurfactants, which are biodegradable substances produced by bacteria, yeasts and fungi. In this context, this work aims to study the biosurfactant production by a strain isolated from a Brazilian mangrove, as well evaluate its functional properties and applicability. The results has presented that the biosurfactant produced by strain ICA56, in mineral medium, was capable to reduce the surface tension of water from 72 to 30 mN.m⁻¹ and interfacial tension on a water/gasoline system from 15 to 3 mN.m⁻¹, showing its efficiency as a tensoactive. The biosurfactant was capable to produce stable emulsion on some hydrophobic sources, as motor oil, soybean oil, hexane and kerosene. The emulsifying and tensoactive properties of the bioproduct formed on ICA56's cultivation have showed some stability through the environmental variations of pH, temperature and saline concentration, presenting some evidences of its wide applicability. Another result which proves the efficiency for the biosurfactant produced is the critical micelle concentration around 25 mg.L⁻¹. The biosurfactant produced was able to remove hydrocarbons and heavy metals in contaminated environments simulating systems, presenting efficiency when it's compared to chemical surfactants. Despite the efficiency of the functional properties and applicability of the biosurfactant, the production in mineral medium was around 200 mg.L⁻¹, which is a reasonable concentration. So, it was evaluated 2 alternatives in order to increase the biosurfactant production: the influence of oxygen transfer and the use of unconventional substrates. The variation of agitation and aeration in bioreactor didn't seemed to present such a significant result, showing that the operational condition of 200 rpm for agitation and 1 L.min⁻¹ for aeration was the best among the tested conditions for biosurfactant production. However, the use of unconventional substrates proved to be a better alternative in order to increase the biosurfactant production, as well as reducing costs in the process, as higher yields were observed in comparison to mineral medium. Substrates such as sunflower oil and glycerol are presented as potential carbon sources for biosurfactant production by strain ICA56, obtaining concentrations of 870 mg.L⁻¹ and 1420 mg.L⁻¹ of the product of interest, in its raw form, respectively.

Keywords: biosurfactant, bioremediation, toxicity, low cost substrates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Derramamento de petróleo nos EUA, causado pelo navio Exxon Valdez da ExxonMobil em 1989	23
Figura 2 –	Espécie de ave atingida por derramamento de petróleo na Baía de San Francisco em 2007.....	23
Figura 3 –	Estruturas da molécula de SDS (A), um surfactante químico do tipo aniônico, e do Triton X-100 (B), do tipo não iônico	27
Figura 4 –	Estrutura de organização das moléculas de tensoativos como micelas	28
Figura 5 –	Mecanismo de ação dos dispersantes em ambientes marítimos contaminados com óleo - A) Aplicação do dispersante químico na mancha de óleo; B) O solvente ocasiona a interação do surfactante com o óleo; C) As moléculas de surfactante migram para a interface óleo/água, reduzindo a tensão superficial; D) As gotículas de óleo são circundadas pelas estruturas micelares dos surfactantes, estabilizando a dispersão, o que ajuda a promover uma rápida diluição pelo movimento da água; E) As gotas dispersam por mistura turbulenta deixando apenas uma fina camada do óleo na superfície	30
Figura 6 –	Subdivisões dos principais biossurfactantes lipopeptídeos	36
Figura 7 –	Mecanismo de ação do biossurfactante em solos contaminados com metais	44
Figura 8 –	Colônias da cepa ICA56 em meio APGE	52
Figura 9 –	Esquema ilustrativo do cultivo da cepa ICA56 para produção de biossurfactante em agitador orbital	55
Figura 10 –	Configuração do biorreator utilizado	63
Figura 11 –	Produção de biossurfactante pela cepa ICA56 em meio mineral em agitador orbital, 150 rpm e 30°C: Crescimento celular (■), consumo de substrato(●) e formação de produto (▲)	68
Figura 12 –	Tensão superficial (●) e pH (■) durante cultivo de cepa ICA56 em meio mineral em agitador orbital, 150 rpm e 30°C	69
Figura 13 –	Tensão interfacial do biossurfactante bruto produzido pela cepa ICA56 em meio mineral, livre de células, frente ao querosene, hexadecano, hexano e gasolina	72

Figura 14 – Concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante obtido no cultivo da cepa de ICA56 em meio mineral.....	73
Figura 15 – Emulsão formada entre solução rica em biossurfactante e algumas fontes hidrofóbicas	76
Figura 16 – Índice de emulsificação do biossurfactante produzida no cultivo da cepa ICA56, em meio mineral, comparado aos obtidos com surfactantes sintéticos (SDS e Triton X-100) em óleo de motor, lubrificante e óleo de soja	78
Figura 17 – Efeito da variação do pH no Índice de Emulsificação na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral	80
Figura 18 – Efeito da variação da temperatura no Índice de Emulsificação na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral	82
Figura 19 – Efeito da variação da força iônica no Índice de Emulsificação na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral	83
Figura 20 – Na imagem superior: areia limpa sem contaminação. Imagem inferior: areia contaminada com petróleo após tratamento com água, caldo fermentado e solução do biossurfactante bruto	87
Figura 21 – Imagem da solução de lavagem após utilização no tratamento de areia contaminada com óleo de motor e petróleo	87
Figura 22 – Remoção de metais pesados pelo biossurfactante produzida no cultivo da cepa ICA56, em meio mineral, comparado a surfactantes sintéticos (SDS e Triton X-100)	91
Figura 23 – Índice de Germinação da espécie de alface <i>Lactuca sativa</i> em diferentes concentrações do biossurfactante produzido no cultivo da cepa ICA56 em meio mineral	92
Figura 24 – Taxa de mortalidade do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> em diferentes concentrações do biossurfactante produzido no cultivo da cepa ICA56 em meio mineral (ajuste exponencial dos dados)	95

Figura 25 – Fermentação para produção de biossurfactante - Saturações de oxigênio em função do tempo para vazão de $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de O_2 e agitação de 200 rpm. (O gráfico superior é equivalente oxigênio dissolvido durante o período que k_{LA} foi determinado, e o inferior representa os dados para o cálculo do k_{LA} linearizados pelo modelo proposto)	99
Figura 26 – Diagrama de Pareto mostrando a contribuição da agitação e aeração na transferência de oxigênio (k_{La}) no cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada	101
Figura 27 – Superfície resposta para a biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) em função das taxas de aeração e agitação para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada	102
Figura 28 – Superfície resposta para a produção de biossurfactante ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), em função das taxas de aeração e agitação, para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada	104
Figura 29 – Produção de biossurfactante pela cepa ICA56 em agitador orbital, 150 rpm e 30°C em meio de cultivo contendo óleo de girassol: Crescimento celular (■) consumo de substrato(●) e formação de produto (▲)	109
Figura 30 – Produção de biossurfactante pela cepa ICA56 em agitador orbital, 150 rpm e 30°C em meio de cultivo contendo glicerol: Crescimento celular (■) consumo de substrato(●) e formação de produto (▲)	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais vazamentos de petróleo no mundo	22
Tabela 2 – Tipos de biossurfactantes e micro-organismos produtores	34
Tabela 3 – Funções e aplicações dos biossurfactantes em diferentes setores industriais	41
Tabela 4 – Produtos comercializados que utilizam biossurfactantes em sua composição e suas respectivas aplicações	47
Tabela 5 – Alguns exemplos de substratos de baixo custo utilizados na produção de biossurfactantes por variados micro-organismos	50
Tabela 6 – Composição do meio mineral	52
Tabela 7 – Composição da solução de micronutrientes	53
Tabela 8 – Composição meio mineral com glicerol	66
Tabela 9 – Composição meio mineral com óleo de girassol	67
Tabela 10 – Valores de Concentração Micelar crítica (CMC) da surfactina obtidos em outros estudos	74
Tabela 11 – Índice de emulsificação (E_{24}) do biossurfactante produzido pela cepa ICA56, em meio mineral, frente algumas fontes hidrofobicas	76
Tabela 12 – Potencial de remoção de hidrocarbonetos de areia contaminada com petróleo e óleo de motor, por diferentes tratamentos	86
Tabela 13 – Potencial de remoção de metais pesados pelo biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral	90
Tabela 14 – Influência da variação na agitação e aeração, de biorreator de bancada para cultivo da cepa ICA56, na biomassa, formação de produto, tensão superficial e coeficiente de transferência de oxigênio em 24 horas de cultivo	100
Tabela 15 – Avaliação de resíduos agroindustriais na produção de biossurfactante pelo cultivo da cepa ICA56 em agitador orbital	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Impactos ambientais da indústria petrolífera	21
2.2	Técnicas de contenção para vazamentos de óleo	25
2.3	Surfactantes químicos	27
2.4	Biosurfactantes	31
2.4.1	Classificação química dos biosurfactantes	32
2.4.2	Micro-organismos produtores de biosurfactantes	33
2.4.3	Biosurfactantes do tipo lipopeptídeos	35
2.5	Propriedades dos biosurfactantes	37
2.6	Aplicações dos biosurfactantes	40
2.6.1	Biorremediação de ambientes contaminados com óleo	42
2.6.2	Remoção de metais pesados	43
2.7	Aspectos econômicos na produção de biosurfactantes	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	Micro-organismo e meio de manutenção e estoque	52
3.2	Produção de biosurfactante	53
3.2.1	Preparação do inóculo	53
3.2.2	Propagação do inóculo e meio de cultivo em agitador rotatório	53
3.3	Extração e purificação do biosurfactante produzido	55
3.4	Métodos analíticos	56
3.4.1	Determinação da concentração de biomassa	56
3.4.2	Determinação da concentração de substrato	56
3.5	Caracterização das propriedades funcionais do biosurfactante produzido pela cepa ICA56	56
3.5.1	Tensão superficial e interfacial	56
3.5.2	Índice de emulsificação	57
3.5.3	Concentração Micelar Crítica (CMC)	58
3.5.4	Estabilidade frente variações de pH, temperatura e concentrações salinas	58

3.6	Avaliação do potencial da utilização do biosurfactante produzido em biorremediação	58
3.6.1	Avaliação do potencial do biosurfactante produzido em remover metais pesados de efluente contaminado	58
3.6.2	Avaliação do potencial do biosurfactante produzido em remover hidrocarbonetos de solo contaminado	59
3.7	Bioensaios de toxicidade	60
3.7.1	Teste de germinação com <i>Lactuca sativa</i>	60
3.7.2	Sobrevivência das larvas de <i>Artemia salina</i>	61
3.8	Cultivo aeróbio em biorreator	62
3.8.1	Configuração do biorreator	62
3.8.2	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) em biorreator de bancada	64
3.9	Avaliação de substratos de baixo custo na produção de biosurfactante	65
3.9.1	Glicerol	65
3.9.2	Soro de Leite	66
3.9.3	Suco de Caju Clarificado	66
3.9.4	Óleo de Girassol	66
3.10	Influência do tempo na produção de biosurfactante em agitador orbital	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Influência do tempo na produção de biosurfactante pela cepa ICA56 em meio mineral	68
4.2	Estudo das propriedades tensoativas do biosurfactante produzido	71
4.3	Avaliação da capacidade emulsificante do bioproduto formado	75
4.4	Estabilidade das propriedades tensoativas e emulsificantes frente a variações de pH, temperatura e força iônica (% NaCl)	79
4.4.1	Efeito do pH	79
4.4.2	Efeito da temperatura	81
4.4.3	Efeito da força iônica	83

4.5	Aplicação do biosurfactante produzido na remoção de hidrocarbonetos em areia contaminada	85
4.6	Aplicação do biosurfactante produzido na remoção de metais pesados	89
4.7	Bioensaios toxicológicos	92
4.7.1	Teste de germinação com <i>Lactuca sativa</i>	92
4.7.2	Teste de mortalidade do microcrustáceo da espécie <i>Artemia salina</i>	94
4.8	Avaliação do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{LA}) na produção de biosurfactante	97
4.9	Avaliação de substratos não convencionais para a produção de biosurfactante	106
4.9.1	Influência do tempo na produção de biosurfactante em óleo de girassol	109
4.9.2	Influência do tempo na produção de biosurfactante em glicerol	111
5	CONCLUSÕES	114
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
7	ANEXO	132

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 40% da fonte energética brasileira é de origem petrolífera, mostrando assim a atual dependência dessa fonte energética. Essa dependência em relação ao petróleo é acompanhada de riscos, já que os constituintes do petróleo são compostos orgânicos altamente poluentes que podem causar sérios danos ao ambiente, durante seu processo produtivo, refino, transporte e armazenamento e distribuição de derivados. Estão envolvidos riscos de derramamentos acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados (CRAPEZ *et al.* 2002).

Derramamentos de petróleo e seus derivados resultam na contaminação dos oceanos e nos ecossistemas relacionados. Por exemplo, o derramamento de petróleo na Baía de San Francisco ocorrido em 2007, onde o vazamento de 58 mil galões de petróleo se estendeu fora da baía até além da ponte Golden Gate, ameaçou diretamente a sobrevivência de gaivotas, focas e outros animais que vivem no local (CRUZ, 2012).

Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo apresentam grandes riscos ambientais, sendo que estes riscos são potencializados se houver concentrações consideráveis de metais nos efluentes petrolíferos. As contaminações por hidrocarbonetos e metais são grandes preocupações ambientais, mas poucas tecnologias são capazes de amenizar os efeitos destes dois contaminantes, simultaneamente. Íons metálicos não são biodegradáveis e apresentam elevada toxicidade (MULLINGAN *et al.* 1999).

Uma das medidas mais utilizadas na contenção de manchas de óleo nos oceanos consiste na utilização de agentes dispersantes. Os dispersantes de óleo utilizados em processo de remediação são constituídos de uma mistura de surfactantes sintéticos, solventes orgânicos e alguns aditivos. A aplicação destes dispersantes minimizam os efeitos causados pelos hidrocarbonetos que constituem o petróleo, entretanto estas substâncias acabam acarretando outros problemas ao ecossistema marinho, devido sua elevada toxicidade e baixa, ou nenhuma, biodegradabilidade (RUFINO *et al.* 2013).

Recentemente têm-se dado grande ênfase aos impactos ambientais causados pelos surfactantes químicos, principalmente devido sua elevada toxicidade e dificuldade

em ser biodegradado no meio ambiente. Com o crescimento da preocupação ambiental, o desenvolvimento da biotecnologia e adoção de leis ambientais extremamente rígidas, têm conduzido os biossurfactantes como uma potencial alternativa aos surfactantes químicos ou sintéticos, derivados do petróleo (HENKEL *et al.* 2012).

Biossurfactantes, ou surfactantes microbiológicos, constituem uma série de espécies químicas com propriedades tensoativas similares aos surfactantes químicos. São produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de bactérias, leveduras e fungos. Os biossurfactantes apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos: baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental, biodegradabilidade no solo e na água, possibilidade de produção por fontes renováveis, além de tolerância à condições extremas de temperatura, pH e força iônica, e serem biodegradáveis no solo e na água (AL-WAHAIBI *et al.* 2013). Os biossurfactantes são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de tensoativo (PERREIRA *et al.* 2013).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes, produzidos a partir de micro-organismos, é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, agente quelante, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Estas propriedades funcionais de cada biossurfactante podem variar dependendo do meio de cultivo e micro-organismo utilizados, bem como das condições operacionais, tais como pH, temperatura, agitação e aeração do sistema reacional. A aplicabilidade de biossurfactantes pode ser observada em diversos campos, como: agricultura, construção, indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos, entretanto a indústria petrolífera é apresentada como um dos principais mercados de interesse dos biossurfactantes (AL-BHARY *et al.* 2013, REIS *et al.* 2013).

Apesar de estas moléculas serem apresentadas como promissora para diversas aplicações industriais, devido suas características funcionais e vantagens, sua produção em escala industrial é dificultada pelo elevado custo de produção. A viabilidade da utilização de biossurfactantes em larga escala depende diretamente do desenvolvimento de processos mais baratos e que possam utilizar materiais renováveis e de baixo custo. Dois principais gargalos podem ser apontados como fatores que afetam o custo da produção: o meio de cultivo e a purificação desta biomolécula, que equivalentem a aproximadamente 30% e 60% dos custos do processo de produção,

respectivamente. Estudos que visem à redução nos custos de produção de biossurfactantes são tidos como promissores, e estes estudos incluem principalmente a utilização substratos de baixo custo, como resíduos industriais, bem como a redução e a otimização de etapas de purificação (MAKKAR *et al.* 2011; RAMKRISHNA, 2010).

A bioconversão de resíduos em produtos de elevado valor agregado apresentam um novo fluxo de produtos para o setor industrial, com o diferencial de serem descartados em alguns processos e serem utilizados como matéria-prima em outros. Uma variedade de subprodutos ou resíduos, que incluem derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas tem sido utilizados na produção de biossurfactantes (REIS *et al.* 2013).

Neste contexto, os objetivos desse estudo visam à avaliação da produção de biossurfactante pela cepa ICA56, isolada de manguezal no município de Icapuí (CE), bem como estudar as propriedades funcionais deste bioproduto formado, e analisar o seu potencial de aplicabilidade na remoção de contaminantes, como hidrocarbonetos e metais pesados. Este trabalho também tem como objetivo estudar possibilidades de otimizar a produção do biossurfactante, com uma redução nos custos do processo, como a utilização de resíduos industriais como substrato.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impactos ambientais da indústria petrolífera

A necessidade por energia teve seus principais primórdios na Revolução Industrial, onde se iniciaram a obtenção de energia baseada no uso intensivo de combustíveis fósseis, com o carvão mineral e petróleo, fatos que podem ser refletidos até a contemporaneidade.

Atualmente, combustíveis fósseis constituem a principal fonte de energia, servindo também como base para fabricação dos mais variados produtos, dentre os quais se destacam benzinhas, óleo diesel, gasolina, alcatrão, polímeros plásticos e até mesmo medicamentos. O Brasil possui um grande número de bacias sedimentares, onde muitas delas se constituem em reservatórios de petróleo, distribuídas tanto na área continental, onshore, como na marítima, offshore, sendo que mais de 70% do petróleo produzido no país é oriundo de poços localizados na plataforma continental. Aproximadamente 40% da fonte energética brasileira é de origem petrolífera, mostrando assim a atual dependência dessa fonte energética (CRUZ, 2012).

O petróleo consiste, basicamente, de uma mistura de hidrocarbonetos, parafínicos, naftênicos e aromáticos, com certa quantidade de elementos metálicos e metalóides, principalmente na forma de compostos organometálicos ou de dispersão de colóides inorgânicos (DALEMOUNT *et al.* 1961).

Essa dependência em relação ao petróleo é acompanhada de riscos, já que os constituintes do petróleo são compostos orgânicos altamente poluentes que podem causar sérios danos ao ambiente, durante seu processo produtivo, refino, transporte e armazenamento e distribuição de derivados. Estão envolvidos riscos de derramamentos acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados (CRAPEZ *et al.* 2002).

Grande parte da produção petrolífera brasileira provém de plataformas marítimas, e isso torna a região costeira bastante vulnerável a acidentes. O Brasil apresenta uma zona costeira litorânea de aproximadamente 8.500 km. A causa de

derramamentos acidentais de petróleo, e seus derivados, em regiões marítimas estão relacionados ao envelhecimento ou falha de equipamentos (quebras de canalização), desastres naturais (furacões e inundações) ou erros humanos (CRUZ, 2012). A Tabela 1 apresenta os maiores vazamentos de petróleo no mundo em oceanos.

Tabela 1 – Principais vazamentos de petróleo no mundo.

Ano	País	Volume derramado (milhões de toneladas)
2010	EUA	597
1979	Mexico	476
1979	Trindad-Tobago	287
1983	Irã	272
1991	Angola	260
1983	África do Sul	252

Fonte: BBC News (www.bbc.co.uk/portuguese, 2011).

A Figura 1 apresenta uma imagem do derramamento de petróleo nos EUA em 1989 causada pelo navio “Exxon Valdez”. Apesar deste acidente não ter gerado grandes volumes de óleo derramado no mar (37 milhões de toneladas), quando comparado aos da Tabela 1, este foi um dos acidentes mais desastrosos ocasionados pela indústria petrolífera. De acordo com as estimativas, morreram 250.000 pássaros marinhos, 2.800 lontras marinhas, 250 águias e 22 orcas, além da perda de bilhões de ovos de salmão, causando um desequilíbrio no ecossistema local e possivelmente no global. A Figura 2 mostra uma espécie de ave atingida por derramamento de petróleo na Baía de San Francisco ocorrido em 2007, onde o vazamento de 58 mil galões de petróleo se estendeu fora da baía até além da ponte Golden Gate, ameaça a sobrevivência de gaivotas, focas e outros animais que vivem no local.

Figura 1 – Derramamento de petróleo nos EUA, causado pelo navio Exxon Valdez da ExxonMobil em 1989.



Fonte: www.ciencia.hsw.uol.com.br, 2010.

Figura 2 – Espécie de ave atingida por derramamento de petróleo na Baía de San Francisco em 2007.



Fonte: www.ciencia.hsw.uol.com.br, 2010.

Tais desastres mostraram como o petróleo é danoso ao ambiente marinho, mas eles também serviram para o desenvolvimento de técnicas para lidar com os derrames acidentais – chamados de marés negras no mar e nas praias. Essas técnicas

incluem, em geral, métodos físicos e químicos, como barreira de contenção, aparelhos de sucção, jatos d'água para dispersar o óleo, materiais absorventes, formadores de gel, precipitantes e dispersantes químicos (CRAPEZ *et al.* 2002).

Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo apresentam grandes riscos ambientais, sendo que estes riscos são potencializados se houver concentrações consideráveis de metais nos efluentes petrolíferos.

Metais estão naturalmente presentes no petróleo, podendo ter sido originado do material vegetal que deu origem ao óleo, ou de rochas ou solo nas proximidades de onde foi originado. Metais pesados são encontrados em pequenas doses naturalmente, sendo outros indispensáveis, pois são elementos traços constituintes de enzimas. Todavia, se o meio estiver com elevadas doses destes metais, animais e vegetais irão absorvê-los, gerando intoxicação. Geralmente, o limite de toxicidade de um metal é tanto mais baixo quanto menos útil ao organismo este metal for (SANTANA, 2008).

Segundo Barros (2001), bioquimicamente, o mecanismo de ação dos metais pesados é devido à elevada afinidade dos cátions por enxofre presentes nas enzimas que controlam a velocidade das reações metabólicas críticas no corpo humano. Estes metais atacam estas enzimas afetando sua atividade enzimática. A exposição a estes metais em águas subterrâneas, pode causar sérios danos, pois estes poluentes se acumulam em animais, plantas e seres humanos. Este acúmulo pode gerar alterações em plantas e animais.

As fontes de metais pesados incluem: aerosóis de combustíveis industriais e urbanos, operações de refino, incineração, atividade de mineração e efluentes industriais e agrícolas.

Diversas rotas são fontes de introdução desses elementos nas frações de petróleo e produtos derivados. Por exemplo, durante o processo de destilação do óleo cru, onde os compostos organometálicos mais voláteis são transferidos para as suas frações mais leves. A corrosão também pode contribuir na introdução de elementos metálicos nos derivados do petróleo, pois durante longo tempo de estocagem ou processamento, alguns desses elementos podem ser introduzidos como contaminantes devido à corrosão de tanques e equipamentos. Segundo Dalemount *et al.* (1961), um exemplo típico é a presença de vanádio e níquel, que podem estar na forma de

complexos organometálicos. Complexos semelhantes dos elementos ferro, cobre, zinco, cobalto, mercúrio e cromo também são encontrados na composição do petróleo.

O desempenho de combustíveis, tais como diesel, gasolina e querosene de aviação, é altamente afetado devido à presença de espécies metálicas. No caso do óleo diesel, a presença de espécies químicas contendo Cu, Fe, Ni, entre outros, pode ocasionar a catálise de reações de oxidação que diminui o seu desempenho como combustível. Em unidades de refino ou de craqueamento catalítico, vanádio, níquel, ferro e cobre presentes no óleo combustível agem como catalisadores tóxicos (DALEMOUNT *et al.* 1961).

O derramamento de petróleo e seus derivados em ambientes marinhos é atualmente um dos principais problemas ambientais. Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo já apresentam por si grandes riscos ambientais, sendo que estes riscos podem ser potencializados se houver concentrações consideráveis de metais pesados nos efluentes petrolíferos. Poucas tecnologias são capazes de amenizar os efeitos destes dois contaminantes, simultaneamente. Íons metálicos não são biodegradáveis e apresentam elevada toxicidade. Assim, a remediação de hidrocarbonetos de baixa volatilidade e metais é apresentada como uma grande preocupação ambiental (MULLINGAN *et al.* 1999).

2.2 Técnicas de contenção para vazamentos de óleo.

Existem diversas tecnologias que podem ser utilizadas com o objetivo de redução dos efeitos danoso causados por derramamentos de petróleo, e a escolha da técnica é crucial para minimização dos impactos ambientais gerados (THAVASI *et al.* 2011).

Segundo Ferrão (2010), a técnica mais comum é a utilização de barreiras constituídas de materiais sorventes polimétricos com propriedades de elevada resistência mecânica e fisico-química. Estas barreiras atuam bloqueando ou mesmo direcionando a mancha de petróleo para localidades que possam ser menos danosas e com maior facilidade de recolhimento, além da possibilidade de utilização na proteção

de locais estratégicos, evitando que a mancha possa atingir áreas de interesse socioeconômico ou ecológico.

Outra técnica consiste na utilização de *skimmers*. São dispositivos de sucção que atuam removendo o óleo que fica alocado na superfície da água. Entretanto esta técnica não é muito eficiente, pois existe a tendência natural do óleo de espalhar no oceano, de acordo com a atuação dos ventos, ondas e corrente marinha (FERRÃO, 2010).

Já a queima in-situ consiste no processo de combustão do óleo derramado no mar no local ou nas proximidades. Esta metodologia é dificultada por alguns fatores como o perigo da fonte de ignição de queima e a formação de resíduos tóxicos, além de questões de segurança. Apesar de ainda não ser regulamentando no Brasil ainda, esta técnica de contenção é amplamente utilizada no Canadá, EUA, Inglaterra e Suécia (FERRÃO, 2010).

A técnica de biorremediação pode ser considerada como uma alternativa promissora e ecologicamente adequada na redução dos impactos ambientais gerados por derramamento de petróleo e derivados. São utilizados micro-organismos ou metabólitos microbianos que visem reduzir a concentração ou toxicidade de algum poluente (ROSA, 2001). Esta técnica tem recebido bastante notoriedade e tem se mostrado como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais (THAVASI *et al.* 2011).

A desvantagem desta técnica está relacionada ao longo tempo de resposta que torna necessária a adição de mecanismos que possam acelerar este processo, como por exemplo, a utilização de surfactantes.

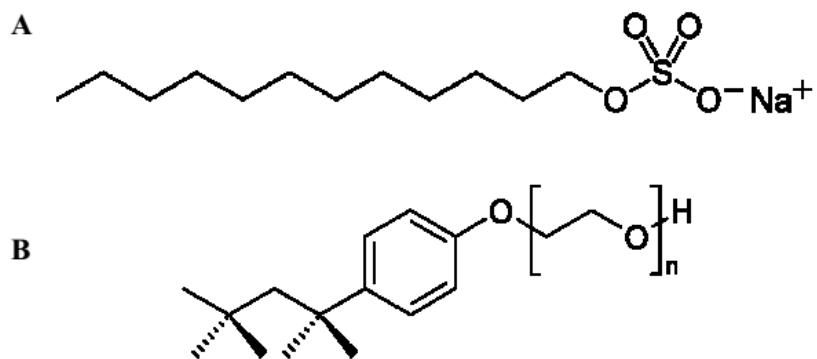
Os efeitos positivos da utilização de surfactantes incluem: aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos na fase líquida, dessorção de hidrocarbonetos e metais pesados sorvidos no solo e a facilidade de difusão de hidrocarbonetos da fase sólida para a líquida, aumentando então a biodisponibilidade do óleo para ação dos micro-organismos degradadores de petróleo (MILLIOLI, 2009; CRUZ, 2012).

2.3 Surfactantes químicos

Surfactantes são espécies químicas que ao serem adicionadas aos líquidos aumentam a sua capacidade de espalhamento e umectação através da redução da tensão superficial. A classificação como tensoativo se refere a estes compostos apresentarem a característica de reduzirem a tensão superficial e interfacial de líquidos (ROCHA, 2007).

São moléculas afinpáticas, ou seja, sua estrutura molecular apresenta uma região hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), o que lhe atribuem a propriedade de se distribuírem nas interfaces entre fases de fluidos com diferentes graus de polaridade, como sistemas água/óleo ou óleo/água. A porção apolar da molécula pode ser iônica (catiônica ou aniónica), não iônica ou anfótera (DESAI & BANAT, 1997). Se forem adicionados a líquidos imiscíveis, como em um sistema óleo/água, tendem a se acumular na interface entre duas fases, causando a redução da tensão interfacial desse sistema. A Figura 3 apresenta a estrutura molecular de Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 que são surfactantes químicos amplamente utilizados industrialmente.

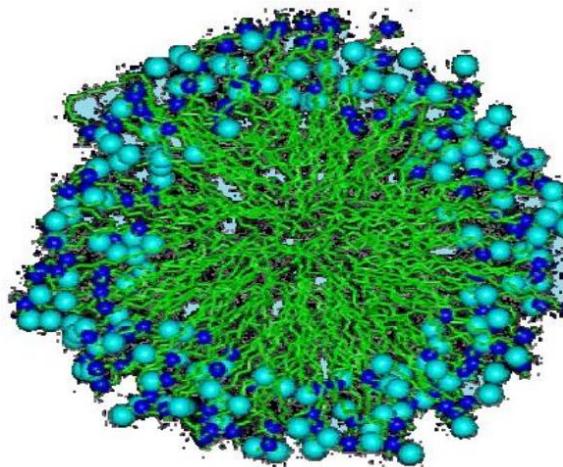
Figura 3 - Estruturas da molécula de SDS (A), um surfactante químico do tipo aniónico, e do Triton X-100 (B), do tipo não iônico.



Fonte: Van Hamme *et al.* 2006.

As moléculas de surfactantes existem como monômeros em concentrações muito diluidas, entretanto quando sua concentração excede um determinado valor (Concentração Micelar Crítica, CMC), estes monômeros se associam espontaneamente gerando agregados de dimensões coloidais, as chamadas micelas. Esta característica de agregar os monômeros de surfactante é justificada pelas características fisico-química estrutura molecular destas espécies químicas (MILLIOLO, 2009). As micelas estão em equilíbrio dinâmico com os monômeros dissolvidos do surfactante, que permanecem em uma concentração aproximadamente constante após a CMC ter sido alcançada (FENDLER & TUNDO, 1984). Esta associação em agregados ocorre principalmente na presença de água ou solvente polar, sendo a estrutura final destes agregados supramoleculares classificadas como microscopicamente ordenada (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011). A Figura 4 apresenta a estrutura da organização das micelas de um surfactante.

Figura 4 - Estrutura de organização das moléculas de tensoativos como micelas.



Fonte: Nitschke, Ferraz & Pastore, 2004.

Quando a CMC é atingida, formam-se várias micelas e o valor da tensão superficial não sofre mais alteração (WITTCOTT e REBBEN, 1980). A eficiência de um surfactante está relacionada a uma baixa CMC, pois assim pouca quantidade de material do surfactante é necessária para se obter aplicabilidade de suas propriedades funcionais (MAKKAR *et al.* 2011).

As reduções de tensões superficial e interfacial estão correlacionadas com a concentração de surfactante até o momento em que CMC é alcançada. Um eficiente surfactante é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN.m⁻¹ e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano de 40 para 1 mN.m⁻¹, além de apresentar baixa concentração micelar crítica (MULLIGAN, 2005).

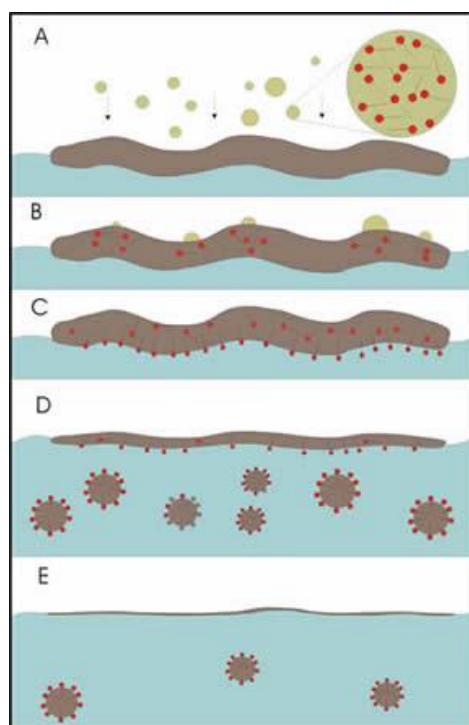
Estas características funcionais dos surfactantes os enquadram em aplicações em diversos setores industriais, dentre eles na receuperação de petróleo e tratamento de resíduos oleosos, indústria farmacêutica, de alimentos e mineração (FIECHTER, 1992).

Apesar da vasta aplicabilidade, a indústria petrolífera é o maior mercado para os surfactantes. São utilizados diretamente na produção dos derivados do petróleo ou são incorporados nas formulações de óleos lubrificantes (DYKE *et al.* 1991). Outro uso está relacionado com o potencial de recuperação de derivados de petróleo na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos (LIMA, 1996).

A indústria petrolífera utiliza amplamente surfactantes químicos na formulação de dispersantes, que são utilizados em casos de vazamento de petróleo nos oceanos (RUFINO *et al.* 2013).

Dispersantes químicos são substâncias de natureza orgânica utilizados com a finalidadede reduzir a tensão superficial entre o óleo e a água, aumentando a superfície de contato entre os mesmos, através da formação de gotas de óleo no meio aquoso (CRUZ, 2012). Além dos surfactantes, os dispersantes também são constituídos por solventes orgânicos (na proporção de 1:15 a 1:25 do surfactante na CMC para solvente orgânico). A Figura 5 apresenta o mecanismo de ação dos dispersantes em oceanos contaminados com petróleo.

Figura 5 - Mecanismo de ação dos dispersantes em ambientes marítimos contaminados com óleo - A) Aplicação do dispersante químico na mancha de óleo; B) O solvente ocasiona a interação do surfactante com o óleo; C) As moléculas de surfactante migram para a interface óleo/água, reduzindo a tensão superficial; D) As gotículas de óleo são circundadas pelas estruturas micelares dos surfactantes, estabilizando a dispersão, o que ajuda a promover uma rápida diluição pelo movimento da água; E) As gotas dispersam por mistura turbulenta deixando apenas uma fina camada do óleo na superfície.



Fonte: Cruz, 2012.

A utilização destes dispersantes tem sido amplamente difundida desde a década de setenta. A decisão do uso de dispersantes em um vazamento de óleo depende da quantidade e do tipo do óleo ou produto derramado, da distância da costa, da presença de organismos sensíveis, das condições climáticas, das correntes marítimas e dos tipos de dispersantes disponíveis no mercado (CRUZ, 2012).

Apesar de estes dispersantes minimizarem os efeitos danosos causados por vazamento de óleo, estas substâncias acarretam outro problema, pois a maioria é tóxica e de difícil degradação.

A utilização de surfactantes químicos depende da regulamentação ambiental de cada país. No Brasil, a Resolução CONAMA N°269/2000 regulamenta o uso de dispersantes químicos em derrames de óleo no mar e restringe sua aplicação a uma distância menor que 2.000 m da costa.

Maior parte dos surfactantes comercializados é sintetizada a partir de derivados do petróleo, o que lhes concede uma grande desvantagem de sua utilização, tendo em vista a preocupação ambiental entre o mercado consumidor, associado a novas legislações de controle ambiental (HENKEL *et al.* 2012). Estes surfactantes sintéticos são prejudiciais ao meio ambiente, pois apresentam considerável toxicidade e não são biodegradáveis.

Tal fato tem gerado interesse em uma classe de compostos que apresentam as mesmas características destes tensoativos sintéticos: os bio surfactantes, ou surfactantes naturais. Esta classe de composto, de origem microbiana, apresenta a vantagem de terem baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental e a possibilidade de produção por fontes renováveis, além de tolerância a temperatura, pH e força iônica, e serem biodegradáveis no solo e na água (MAKKAR *et al.* 2011).

2.4 Bio surfactantes

Bio surfactantes constituem uma série de espécies químicas com propriedades funcionais similares aos surfactantes químicos (SINGH *et al.* 2007; DEVELTER & LAURYSEM, 2010; FRANZETTI *et al.*, 2010). São produzidos extracelulares ou como parte da membrana celular de bactérias, leveduras e fungos. Apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos: baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental e a possibilidade de produção por fontes renováveis, além de tolerância a temperatura, pH e força iônica, e serem biodegradáveis no solo e na água (MAKKAR *et al.* 2011). Estas vantagens dos bio surfactantes permitem seu enquadramento em uma gama de aplicações industriais, entretanto os altos custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação e purificação não permitem a sua utilização em larga escala (REIS *et al.* 213). Estudos que visem à redução nos custos de produção de bio surfactantes são tidos como promissores, e estes estudos

incluem principalmente a utilização substratos de baixo custo, como resíduos industriais, bem como a redução e a otimização de etapas de purificação (MAKKAR *et al.* 2011).

2.4.1 Classificação química dos biossurfactantes

Diferentemente dos surfactantes sintéticos, que são classificados de acordo com a carga iônica presente na região polar da molécula, os biossurfactantes são classificado de acordo com a natureza bioquímica da molécula ou com a espécie microbiana produtora. A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

As principais classes de biossurfactantes incluem: glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos, fosfolipídeos e biossurfactantes poliméricos (RAMKRISHNA, 2010).

Segundo Banat *et al.* (2010), os glicolipídeos constituem a classe de biossurfactantes mais conhecidos. São carboidratos do tipo mono, di, tri e tetrassacarídeo constituidos de glicose, manose, galactose, ácido glicurônico, rhamnose e sulfato de galactose combinados com longas cadeias de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos. Dentre os biossurfactantes glicolipídeos estão ramnolipídeos, trealilipídeos, soforolipídeos e mannosíleritol lipídeos. O grau de polaridade destes biossurfactantes depende do hidrocarboneto utilizado como substrato (BOGNOLI, 1999). São utilizados na dispersão e degradação de diferentes classes de hidrocarbonetos, emulsificante de óleos vegetais e remoção de metais pesados de solo contaminado (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

Os biossurfactantes do tipo lipopeptídeos e lipoproteína têm recebido destaque devido suas elevadas atividades superficiais e potencial antibiótico. Estes biossurfactantes são relatados como antibióticos, antivirais, imunomoduladores e inibidores de toxinas específicas (REIS *et al.* 2013). Normalmente apresentam elevada massa molar e são solúveis em água (BOGNOLI, 1999). Neste grupo destacam-se surfactina, subtilisina, gramicidina e iturina. Dentre suas aplicações ainda se pode mencionar remoção de metais pesados, solubilizante de hidrocarbonetos em água e emulsificante de hidrocarbonetos e óleos vegetais (AL-WAHAIBI *et al.* 2013).

Os ácidos graxos que apresentam características biossurfactantes são produzidos por algumas bactérias e leveduras, quando n-alcanos são utilizados como

substrato (DESAI & BANAT, 1997). São constituídos de moléculas de ácidos graxos saturados em cadeias variando de 12 a 14 átomos de carbono e grupos hidroxila (RAMKRISHNA, 2010). Nesta categoria destacam-se os ácidos ustálgico e corinomicólico (BOGNOLI, 1999). Apresentam potencial para aplicações como emulsificante, agente quelante, sequestrante de metais e dispersante de corantes hidrofóbicos (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

Os bio surfactantes do tipo fosfolipídeos fazem parte da membrana celular de alguns micro-organismos e são constituídos de uma molécula de glicerol ligada a duas moléculas de ácido graxos por uma ligação éster (RAMKRISHNA, 2010). A produção de fosfolipídeos é afetada diretamente pelas condições de cultivo, bem como pelo substrato utilizado, assim diferentes tipos de bio surfactantes podem ser sintetizados (DESAI & BANAT, 1997). Os principais fosfolipídeos são fosfatidilinositol, fosfatildiglycerol e ácido fosfatídico. Suas principais aplicações incluem emulsificante, agente quelante e solubilizante de hidrocarbonetos (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

Os bio surfactantes poliméricos são polímeros de elevado peso molecular com alta viscosidade. Apresentam elevados índices e emulsificação mesmo em baixas concentrações (0,001 a 0,01%). Os principais bio surfactantes poliméricos são emulsan, liposan, alasan, mannoproteína e biodispersan (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011). A principal aplicação desta classe de bio surfactantes é como agente estabilizante de emulsões água/hidrocarbonetos. Emulsan é um dos mais poderosos estabilizantes tanto de emulsão como de micremulções (RAMKRISHNA, 2010).

2.4.2 Micro-organismos produtores de bio surfactantes

Uma grande variedade de micro-organismos (Tabela 2) é capaz de produzir micro-organismos com diferentes estruturas moleculares, mas com algumas propriedades comuns.

Tabela 2 – Tipos de biosurfactantes e micro-organismos produtores.

Tipo de biosurfactante	Micro-organismo
Glicolipídeos	
- Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola; Torulopsis apícola</i>
- Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis; Bacillus pumilus</i>
- Liquenisina; kurstakina	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Iturina; fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Peptídeo-Lipídeo	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
- Ácidos Graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídeos Neutros	<i>Nocardia erythoropolis</i>
- Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Biosurfactantes poliméricos	
- Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: Slivinski, 2012; Nitschke e Pastore, 2002.

Apesar do potencial de produção ser determinado pela genética da espécie microbiana, os fatores ambientais e a natureza do substrato também pode influenciar o nível de expressão (SOBRINHO, 2007).

É importante salientar que a produção biosurfactantes normalmente está associada a uma mistura de homólogos, cuja composição depende da cepa utilizada, das condições de cultivo e substrato. Da mesma maneira que a sua composição pode variar, as propriedades físico-químicas dos biosurfactantes também são bastante variáveis e dependem diretamente da composição da mistura de homólogos (KRIEGER *et al.* 2009).

Dentre a gama de biosurfactantes e micro-organismos produtores, destaca-se a produção de lipopeptídeos. Estes biosurfactantes são produzidos, em sua maior parte, por bactérias do gênero *Bacillus*, e são apontados como um dos biosurfactantes mais eficientes e de maior interesse comercial (REIS *et al.* 2013).

2.4.3 Biosurfactantes do tipo lipopeptídeos

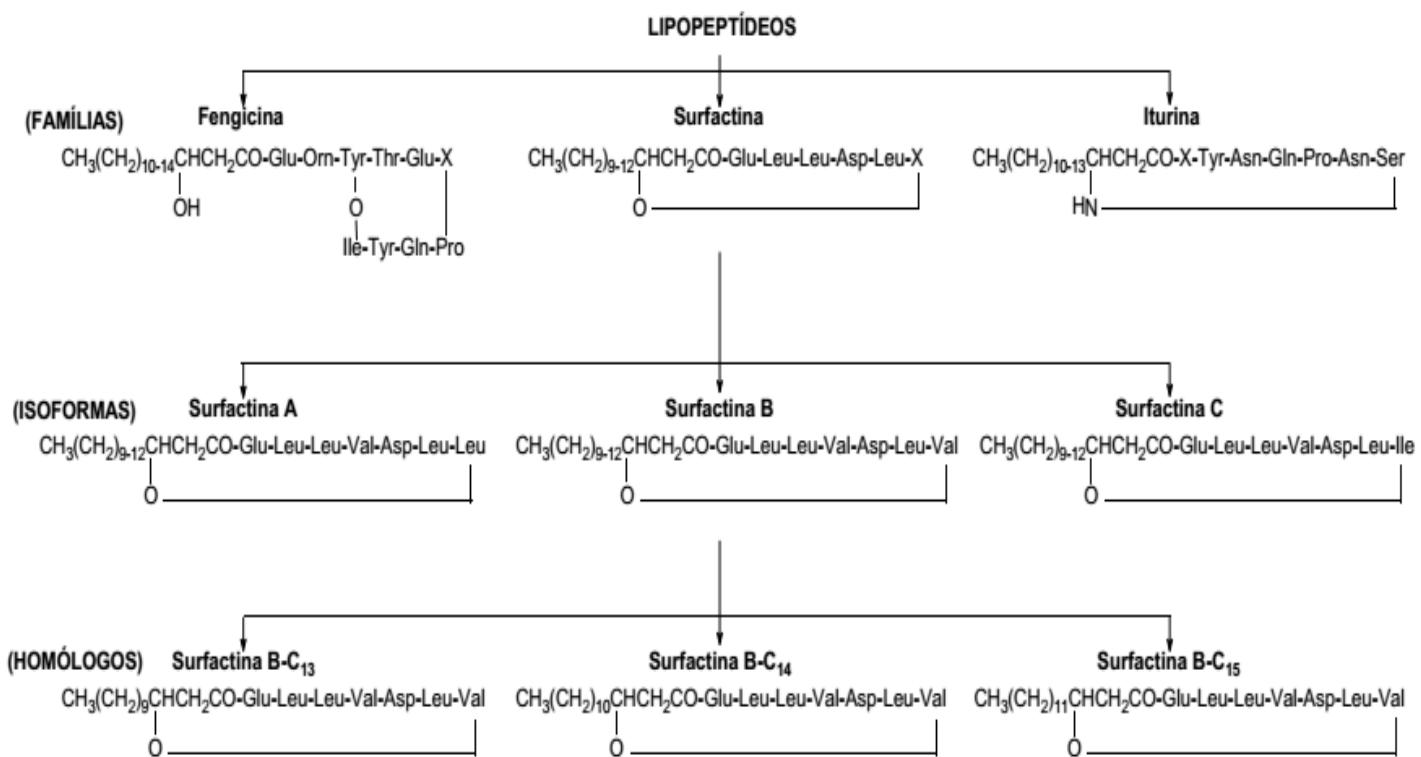
Os lipopeptídeos são moléculas constituídas de ácidos graxos associados a aminoácidos. A região peptídica da molécula pode apresentar características eletrostáticas neutras ou anionicas e os aminoácidos estão normalmente associados em uma estrutura cíclica. Esses peptídeos normalmente são apresentados na forma de misturas de espécies químicas semelhantes, e podem apresentar pequenas diferenças entre si na sua composição de aminoácidos e/ou na sua região lipídica (RAMKRISHNA, 2010; HATHOUT *et al.* 2000; MAIER, 2003).

Existe uma grande diversidade de lipopeptídeos na natureza, bem como dos seus micro-organismos produtores, contudo o gênero *Bacillus* se destaca por ser o grupo responsável pela produção de boa parte dos lipopeptídeos conhecidos atualmente (REIS *et al.* 2013).

Segundo Jacques (2011), os lipopeptídeos mais conhecidos são divididos em três famílias: surfactina, iturina e fengicina. Já as famílias dos lipopeptídeos subdividem-se em isoformas, que diferem na composição dos aminoácidos da parte

peptídica. As isoformas podem ainda ser subdivididas em séries homólogas, que apresentam variação no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (ONGENA *et al.* 2007; ROMERO *et al.* 2007; JACQUES, 2011). A Figura 6 apresenta a divisão de famílias e algumas isoformas dos principais bio surfactantes do tipo lipeptídeos.

Figura 6 - Subdivisões dos principais bio surfactantes lipopeptídeos.



Fonte: Slivinski, 2012.

No grupo da surfactina, têm-se os bio surfactantes mais eficientes conhecidos, pois em baixas concentrações ($0,017 \text{ g.L}^{-1}$), apresenta a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN.m^{-1} e tensão interfacial de um sistema água/hexadecano de 42 para 1 mn.m^{-1} . A surfactina é um heptapeptídeo cíclico que pode apresentar de 12 a 16 átomos de carbono na sua estrutura molecular. As isoformas podem variar a posição do 7º aminoácido, entre Leu, Val e Ile. Esta variação pode ser afetada pelas condições ambientais e nutricionais do cultivo, bem como pode

ser determinada pela linhagem microbiana analisada (JACQUES, 2011, BUGAY, 2009; LIU *et al.* 2008). Apresentam elevada atividade antibacteriana e antifúngica (RAMKRISHNA, 2010).

A fengicina é um lipopeptídeo que contém o ácido graxo β -hidroxi em sua estrutura, e pode apresentar de 13 a 18 átomos de carbono na molécula, podendo ser saturados ou insaturados, e variando a posição do 6º aminoácido constituinte (Ala-Val), apresentando então duas isoformas (ONGENA *et al.* 2007). A fengicina apresenta forte atividade surfactante e antifúngica, mas mostrou ser ineficiente frente a bactérias e leveduras (ROMERO *et al.* 2007). Singh & Cameotra (2013) apontam a fengicina como um potencial bioproduto para utilização biorremediação, pois este biosurfactante foi capaz de remover hidrocarbonetos e metais pesados de solo contaminado.

Os compostos identificados como iturinas são lipo-heptapeptídeos, assim como a surfactina, entretanto são constituídos por sequência peptídica diferente. Suas cadeias carbônicas podem variar de 13 a 17 átomos de carbono e apresentam o ácido graxo β -amino em sua estrutura. A iturina apresenta 6 isoformas predominantes, as iturinas A e C, a micosubtilisina e as bacilomicinas D, F e L. Apresentam atividade antibiótica e antifúngica, além de potencial para aplicação como pesticida (ROMERO *et al.* 2007; ONGENA *et al.* 2007; VATER *et al.* 2002; RAMKRISHNA, 2010).

Os lipopeptídeos estão entre os biosurfactantes mais eficientes e também são os mais conhecidos, ocasionando grande interesse científico, terapêutico e biotecnológico (JACQUES, 2011, BUGAY, 2009; LIU *et al.* 2008; SINGH & CAMEOTRA, 2013).

2.5 Propriedades dos biosurfactantes

As propriedades físico-químicas dos biosurfactantes, tais como redução de tensão superficial e interfacial, agente espumante e emulsificante, reduzidas concentrações micelares críticas, solubilizante e poder detergente são cruciais na avaliação da sua eficiência e na seção de micro-organismos que apresentem potencial de produção destas biomoléculas (REIS *et al.* 2013).

Segundo Pacwa-Płociniczak *et al.* (2011), apesar da diversidade de composição química e de micro-organismos produtores, algumas propriedades são comuns para a maioria dos bio surfactantes. Estas propriedades são apresentadas como vantagens em relação aos surfactantes sintéticos.

- Atividade superficial e interfacial: os bio surfactantes são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos, pois apresentam menores valores de tensão superficial e interfacial em menores concentrações de tensoativo. Um eficiente bio surfactante é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN.m⁻¹ e interfacial de um sistema água/hexano de 40 para 1 mN.m⁻¹ (RAMKRISHNA, 2010). A CMC é comumente utilizada para medir a eficiência de um surfactante. A concentração micelar crítica dos bio surfactantes variam de 1 a 200 mg.L⁻¹. Eficientes bio surfactantes apresentam reduzidos valores de CMC, pois assim pouca quantidade destas biomoléculas é necessária para se obter eficiência como tensoativo (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).
- Agente emulsificante: emulsões formadas com bio surfactantes são mais estáveis e com elevados índices de emulsificação do que as obtidas com surfactantes sintéticos. Os bio surfactantes podem gerar emulsões que apresentem estabilidade macro e microscopicamente durante meses (RAMKRISHNA, 2010). Bio surfactantes de elevado peso molecular são mais eficientes do que os de baixo peso molecular (BOGNOLI, 1999).
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos bio surfactantes apresentam elevada estabilidade de suas propriedades funcionais, quando submetidos à variações ambientais de temperatura, pH e força iônica (RAMKRISHNA, 2010). Os bio surfactantes não são afetados por temperaturas até 90 °C (BOGNOLI, 1999). Knoblich *et al.* (1995) apresenta que o pH pode afetar o tamanho e o formato das segregações micelares formadas pelos bio surfactantes, entretanto estas variações não são tão significativas ao ponto de reduzir sua eficiência como agente tensoativo e emulsificante. Segundo Nitschke & Pastore (2002), os bio surfactantes suportam concentrações salinas até valores próximos a 10% (m/v NaCl), ao passo que os surfactantes sintéticos são inativados por concentração salina em torno de 2 a 3% (m/v NaCl).

- Baixa toxicidade e biocompatibilidade: a crescente preocupação com efeitos alérgicos de produtos artificiais tem incentivado os estudos de produção de biossurfactantes. A maioria dos biossurfactantes apresenta baixa ou nenhuma toxicidade, o que pode viabilizar sua aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (LUNA *et al.* 2013). Os biossurfactantes são facilmente degradados no solo e na água, diferentemente dos surfactantes sintéticos, o que possibilita sua aplicação em biorremediação e tratamento de efluentes (RAMKRISHNA, 2010).
- Ação antimicrobiana: alguns biossurfactantes apresentam ação antimicrobiana, resultando na destruição de outros micro-organismos pela lise de suas membranas celulares. No microambiente, esta propriedade é importante no que se refere a competição por nutriente com outras espécies microbianas (SRIRAM *et al.* 2011).
- Produção por fontes renováveis: os surfactantes sintéticos são derivados do petróleo, ou seja, uma fonte não renovável (HENKEL *et al.* 2012). Já os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis e de baixo custo, como resíduos agroindustriais. A utilização deste reídos apresenta uma vantagem econômica ao processo, ocasiona uma redução de 30% nos custos do processo. A bioconversão de resíduos em produtos de elevado valor agregado apresentam um novo fluxo de produtos para o setor industrial, com o diferencial de serem descartados em alguns processos e serem utilizados como matéria-prima em outros. Uma variedade de subprodutos ou resíduos, que incluem derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas tem sido utilizados na produção de biossurfactantes (MAKKAR *et al.* 2011).

Os biossurfactantes apresentam grande diversidade química, mas apresentam propriedades bastante semelhantes. Estas propriedades têm recebido grande interesse de diversos setores industriais, pois fornecem elevado potencial de aplicações e diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

2.6 Aplicações dos biosurfactantes

Durante a última década, a demanda de surfactantes aumentou cerca de 300%. A produção mundial excede três milhões de toneladas e envolvem cerca de quatro milhões de dólares (CASTIGLIONI *et al.* 2009). Segundo Reis *et al.* (2013), os biosurfactantes são apresentados como potenciais substitutos para os surfactantes sintético em diversos processos como lubrificante, estabilizante de emulsões, dispersante, espumante, anti-espumante, agente quelante em indústrias como alimentícia, farmacêutica, cosmética, além de atuar na biorremediação de contaminantes tanto orgânicos como inorgânicos.

Shete *et al.* (2006) mapeou as patentes de biosurfactantes e bioemulsificantes ao redor do mundo e observou diversos setores industriais possuem patentes destas biomoléculas: indústria petrolífera (33%), cosméticos (15%), biomedicina, como agente antimicrobiano (12%) e biorremediação (11%). A Tabela 3 apresenta algumas aplicações dos biosurfactantes, relacionados às suas respectivas funções, nos diversos setores industriais.

A indústria petrolífera é o maior mercado para os biosurfactantes, onde são utilizados diretamente na produção dos derivados do petróleo ou são incorporados nas formulações de óleos lubrificantes. Outro uso está relacionado com o potencial de recuperação de derivados de petróleo na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos, atuando na biorremediação (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011).

Tabela 3 – Funções e aplicações dos biossurfactantes em diferentes setores industriais.

Indústria	Aplicação	Função
Agricultura	Biocontrole	Biocontrole de micróbios como parasitismo e competição.
Alimentos	Emulsificação; desemulsificação e ingrediente funcional	Estabilizante de emulsões, espumante e agente de interação com proteína, carboidratos e lipídeos.
Ambiental	Biorremediação	Emulsificante, espumante dispersante e agente quelante.
Bioprocessamento	<i>'Downstream'</i>	Biocatálise em sistemas bifásicos e emulsões, recuperação de compostos intracelular e indutor de metabólitos fermentativos e enzimas extracelulares.
Construção civil	Agentes permeabilizadores	Ligaçāo do asfalto à areia e cascalho
Cosmética	Produtos de beleza e saúde	Emulsificantes, solubilizantes, espumantes e mediadores de ação enzimática.
Farmacêutica	Produtos terapêuticos	Inibidor de formação de coágulos, atividade antibacteriana e antifúngica e vacinas.
Metalurgia	Agente quelante e emulsificante	Estabilizante de emulsões e sequestrante de metais
Papel e plásticos	Solubilizante e agente dispersante	Solubilização de fluidos de diferentes polaridades
Petrolífera	Emulsificante, limpeza de reservatórios, solubilizante e formulação de óleos lubrificantes.	Redução da viscosidade de óleos, estabilizantes e desemulsificação de emulsões, solubilização de hidrocarbonetos e aditivos para lubrificantes.

Fonte: Singh *et al.* 2007; Ramkrishna, 2010; Silva, 2012; Sobrinho, 2007.

2.6.1 Biorremediação de ambientes contaminados com óleo

A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar fluidos de polaridade diferente, como hidrocarbonetos em água, aumenta a degradação de poluentes ao ambiente. Os biossurfactantes atuam diretamente na interação interfacial água/óleo, aumentando o contato entre estes líquidos, acelerando então a degradação de óleos por micro-organismos e promovem assim a biorremediação de águas e solos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Micro-organismos degradadores estão naturalmente presentes em oceanos, e a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de petróleo (MULLIGAN, 2005).

A utilização de micro-organismos que utilizam hidrocarbonetos como substratos e produzem biossurfactantes pode ser uma alternativa para redução de custos da utilização de biossurfactantes na biorremediação (RAMKRISHNA, 2010). Os biossurfactantes podem ser utilizados para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo e na água (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Segundo Dyke *et al.* (1991), a utilização de biossurfactantes em remediação está sendo proposto e testado em algumas partes do mundo, para combater a poluição ambiental gerada por derramamentos accidentais de óleo. Este processo previne a persistência de camadas de óleo no ambiente, sendo estes responsáveis pela depleção do oxigênio e intoxicação da vida marinha. Acidentes com petróleo têm sido muito frequentes, portanto tem-se nesta área um vasto campo para a aplicação dos biossurfactantes.

Alguns trabalhos obtiveram sucesso na biorremediação de ambientes contaminados com óleo, com a utilização inóculos microbianos e tratamentos com biossurfactantes. Bognolo (1999) relatou que os biossurfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *Bacillus subtilis* demonstraram potencial na remoção de piche de areia contaminado. Noordman & Janssen (2002) observaram que os rhaminolipídeos, que são biossurfactantes produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, estimulou a degradação de compostos hidrofóbicos em solo contaminado.

Das & Mukherjee (2007) demonstraram que a biodegradação de petróleo cru foi eficiente com a adição dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (surfactina) e *Pseudomonas aeruginosa* (rhaminolipídeos). Das & Mukherjee (2007) também observaram que estas duas bactérias são eficientes produtores de biossurfactantes em ambientes contaminados com petróleo e derivados. Estes autores relataram que o biossurfactante produzido foi capaz aumentar de 5 a 7 vezes a solubilidade de pireno (hidrocarboneto poliaromático de elevada toxicidade), influenciando diretamente a biodegradação deste contaminante.

2.7.2 Remoção de metais pesados

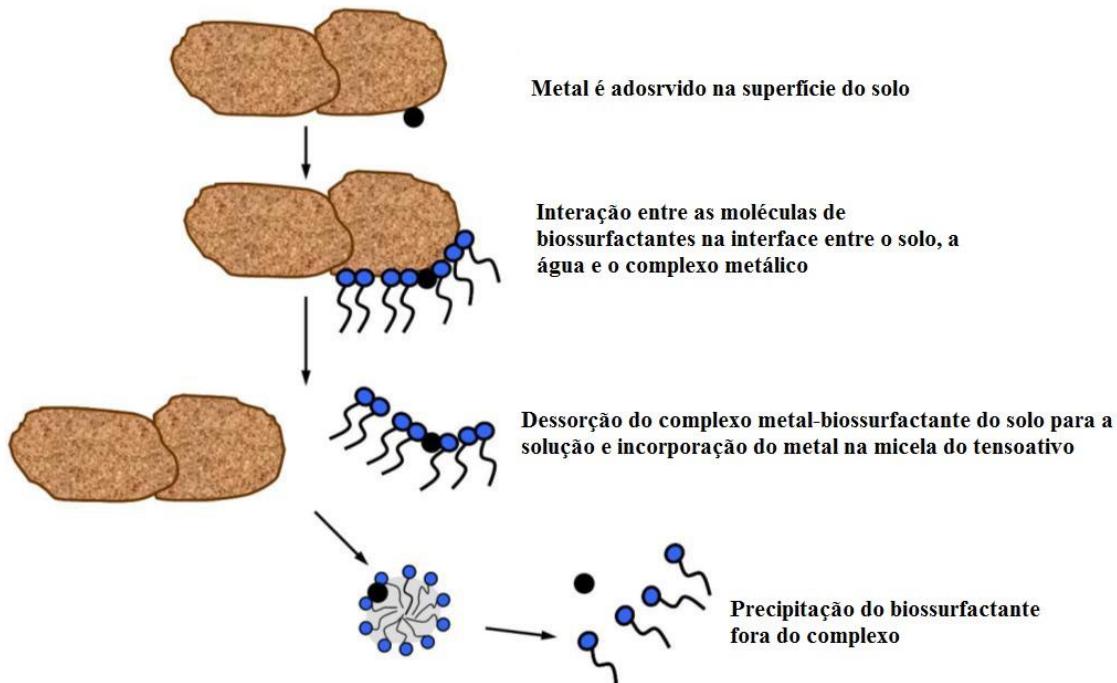
O petróleo consiste, basicamente, de uma mistura de hidrocarbonetos, parafínicos, naftênicos e aromáticos, com certa quantidade de elementos metálicos e metalóides, principalmente na forma de compostos organometálicos ou de dispersão de colóides inorgânicos. Metais estão naturalmente presentes no petróleo, podendo ter sido originado do material vegetal que deu origem ao óleo, ou de rochas ou solo nas proximidades de onde foi originado (DALEMOUNT *et al.* 1961). Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo apresentam grandes riscos ambientais, sendo que estes riscos são potencializados se houver concentrações consideráveis de metais nos efluentes petrolíferos.

As contaminações por hidrocarbonetos e metais são grandes preocupações ambientais, mas poucas tecnologias são capazes de amenizar os efeitos destes dois contaminantes, simultaneamente. Íons metálicos não são biodegradáveis e apresentam elevada toxicidade. Assim, a remediação de hidrocarbonetos de baixa volatilidade e metais é apresentada como uma grande preocupação ambiental. Processos biológicos estão em desenvolvimento e apresentam potencial de baixo custo (MULLIGAN *et al.* 1999).

Biossurfactantes atuam na tensão interfacial e solubilizam hidrocarbonetos na fase aquosa, ou captura as gotas de óleo dentro das micelas, e simultaneamente podem capturar íons metálicos através de interações eletrostáticas ou complexação

(RUFINO *et al.* 2011). A presença de diferentes grupos funcionais de diferentes polaridades nas moléculas de biossurfactante acarreta um interação molecular com a carga dos metais pesados, atuando como um agente quelante, possibilitando a sua remoção de um solo ou efluente contaminado (MULLIGAN *et al.* 1999). Segundo Singh & Cameotra (2013), a remoção de metais pesados por biossurfactantes ocorre possivelmente por complexação da forma livre do metal em solução, agindo como um quelante. A Figura 7 apresenta o mecanismo de ação dos biossurfactantes quando são aplicados em solos contaminados com metais pesados.

Figura 7 - Mecanismo de ação do biossurfactante em solos contaminados com metais.



Fonte: Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011).

Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011) apresenta que a utilização de biossurfactantes em ambientes contaminado com metais pesados é baseado na sua habilidade de formar complexos com os metais. Os biossurfactantes anionicos formam complexos não iônicos com os metais, através de uma ligação iônica. Estas ligações são mais fortes do que as interações eletrostáticas do metal com o solo, possibilitando que o biossurfactante se ligue aos metais e remova estes contaminantes do ambiente contaminado. Íons metálicos também podem ser removidos de ambiente contaminado através de interação eletrostática com a segregação micelar.

formada pelas moléculas de biossurfactantes, pois a ‘cabeça’ polar das micelas apresenta capacidade de interagir com a carga dos metais pesados. Singh & Cameotra (2013) relatam que a redução causada na tensão interfacial permite que o biossurfactante se acumule na interface sólido-solução e tenha contato direto com o metal nesta interface.

Alguns estudos tem apresentado a eficiência de biossurfactantes na remoção de metais pesados, tanto de solo como de efluentes contaminados. Mulligan *et al.* (2001) mostraram que a surfactina foi capaz de remover íons de cobre e zinco de um solo contaminado com hidrocarbonetos (petróleo). Observou-se, nesses estudos, que a remoção de zinco e cobre do solo contaminado foi de aproximadamente 70%, e a remoção de hidrocarbonetos foi de 50%. Os resultados também mostraram que a ação da surfactina na remoção de metais pode ser otimizada se estiver associada com 1% de NaOH. Juwarkar *et al.* (2008) estudaram a ação de di-rhamnoliídeos, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* BS2, na remoção de metais pesados. Estes autores observaram que o biossurfactante produzido foi capaz de remover cromo, zinco, cobre e cádmio de sistema que simulava ambiente contaminado.

Das *et al.* (2009) estudaram a produção de biossurfactante utilizando bactéria isolada de ambiente marinho e avaliaram seu potencial de reduzir os efeitos contaminantes de alguns metais pesados presente em alguns efluentes industriais. Estes autores observaram que o biossurfactante produzido apresentou características aniônicas e foi capaz de interagir diretamente com os metais pesados, através de ligações iônicas, além de gerar um precipitado (complexo metal-biossurfactante), que pode ser facilmente removido da solução por operação unitária de centrifugação.

Gnanamani *et al.* (2010) estudaram a biorremediação de Cr (VI), utilizando o biossurfactante produzido por *Bac. sp.* MTCC 5514. Estes autores observaram que a biorremediação aconteceu em 2 etapas: a redução de Cr (VI) para Cr (III), que é menos tóxico, por meio de metabólitos extracelulares produzidos pela cepa e interação entre o biossurfactante e o metal. Maity *et al.* (2013) realizaram estudo similar, e utilizarem surfactina e surfactantes sintéticos tipo saponinas, e obtiveram remoção de metais pesados inferiores ao presente estudo. Estes autores, ao utilizar surfactina, removeram somente 17% e 24% de íons de cobre e zinco em solução, respectivamente. Quando a solução de surfactina foi adicionada de saponinas, ocorreu um aumento no potencial de

remoção para 47% para íons cobre e 40% para íons de zinco quando comparadas a eficiência dos surfactantes químicos.

2.7 Aspectos econômicos na produção de biosurfactantes

Apesar das vantagens e amplo campo de aplicabilidade, os maiores entraves relacionados à produção de biosurfactantes em larga escala está relacionado aos elevados custos envolvidos nos processos de produção (RAMKRISHNA, 2010; REIS *et al.* 2013).

Dados recentes apontam que o mercado global de biosurfactantes rendeu 1,7 bilhões de dólares em 2011, e espera-se atingir cerca de 2,2 bilhões de dólares em 2018, tendo como base um taxa de crescimento anual em torno de 3,5% por ano. Em 2018, espera-se que a produção global de biosurfactante seja em torno de 500.000 toneladas em 2018, devido à crescente demanda em países na Ásia, África e América Latina, que atualmente já representam 21% dos consumidores deste bioproduto (REIS *et al.* 2013). Estudos (*Technical Insight*) apresentavam estimativas de que em 2010, os biosurfactantes seriam capazes de absorver 10% do mercado de surfactantes sintéticos, com vendas superiores a 200 milhões de dólares (HESTER, 2001).

O número de publicações relacionados a identificação de espécies microbianas produtoras, otimização de processos e rotas metabólicas envolvidos na produção de biosurfactantes, têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (MÜLLER *et al.* 2012). Diversos tipos de biosurfactantes e seus respectivos processos de produção têm sido patenteados, mas poucos têm sido comercializados (KRONEMBERGER *et al.* 2008).

Devido às preocupações ambientais e adoção de leis ambientalistas extremamente rígidas, algumas empresas têm mostrando considerável retorno financeiro ao investirem na comercialização de biosurfactantes, como é caso da Idrabel (Itália) e Jeneil Biotechnology (EUA), que produzem o biorecoil e o biofuture, respectivamente (RAMKRISHNA, 2010). O bioproduto comercializado pela *Jeneil Biotechnology* (biofuture), que apresenta rhaminolipídeos em sua composição, foi eficiente na remoção

de 95% de óleo que estava contaminando solo (REIS *et al.* 2013). A Tabela 4 apresenta alguns produtos comercializados que possuem biossurfactantes em sua composição.

Tabela 4 – Produtos comercializados que utilizam biossurfactantes em sua composição e suas respectivas aplicações.

Produto	Biosurfactante	Fornecedor	Aplicação
BioFuture	Rhamnolipídeos	BioFuture (Irlanda)	Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.
BioRecoil	(Não informado)	Idrabel (Itália)	Limpeza de tanques de petróleo
EC-1800	Consórcio bacteriano	Ecochem (Canadá)	Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.
EC-2100W	Consórcio bacteriano	Ecochem (Canadá)	Degradação de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos contaminados.
EC-601	Rhamnolipídeos	Ecochem (Canadá)	Agente dispersante de hidrocarbonetos em água.
JBR	Rhamnolipídeos	Jeneil Biotech (EUA)	Utilizando no setor agro-industrial
Petrosolv	(Não informado)	Enzyme Tech. (USA)	Remoção de óleo de ambientes contaminados
Surfactin	Surfactina	Sigma-Aldrich (EUA)	Agente antifúngico, antibacteriano e antitumoral

Fonte: Adaptado de Reis *et al.* (2013); RAMKRISHNA (2010).

Segundo Rodrigues & Teixeira (2008), a possibilidade de substituição dos surfactantes sintéticos pelos biossurfactantes depende de fatores como custos, eficiência

e capacidade produtiva. Em aplicações biomédicas farmacêuticas e em cosméticos, por exemplo, é aceitável um processo de produção de biossurfactantes com dispendioso custo, se o produto apresentar considerável valor agregado e a quantidade material utilizada deste bioproduto for reduzida. Entretanto, a utilização mais comum de biossurfactantes, a aplicação ambiental, requer grandes volumes destas biomoléculas, o que pode tornar seu uso inviável.

A vialidade econômica da produção em escala industrial de biossurfactantes depende do desenvolvimentos de estratégias e processos que visem a minimização dos custos envolvidos (MAKKAR *et al.* 2011).

Segundo Ramkrishna (2010), algumas estratégias utilizadas os custos envolvidos na produção de biossurfactantes incluem: seleção de micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes com elevados rendimentos e otimização de processos de purificação ou concentração, e de fermentações em larga escala. Estas estratégias podem se tornar práticas através de manipulação genética dos micro-organismos, o desenvolvimento de processos fermentativos eficientes, por intermédio da otimização do meio reacional e condições de cultivo utilizando ferramentas estatísticas ou por otimização de processos de purificação para obter máxima produção de biossurfactantes, além da utilização de substratos de baixo custo (resíduos agro-industriais).

Apesar dos esforço das pesquisas, o custo de produção de biossurfactante é de aproximadamente de 3 a 10 vezes maior do que o dos surfactantes químicos, dependendo principalmente do processo de downstream adotado (KRONEMBERGER *et al.* 2008). As etapas de downstream dos biossurfactantes podem ser responsáveis por até 60% dos custos do processo de produção (RAMKRISHNA, 2010). As técnicas de purificação de biossurfactantes são muitas vezes dispendiosas e nem sempre são eficientes. Portanto, sempre que possível, metodologias simples e de baixo custo devem ser escolhidas, se forem adequadas ao processo. As metodologias mais comuns de purificação de biossurfactantes envolvem extração com solventes (clorofórmio, metanol, diclorometano, metanol, butanol, acetato de etilo, pentano, hexano, ácido acético e éter) ou precipitação ácida. No entanto, recentes estudos têm apontado outras técnicas que pode ser mais eficientes como precipitação com sulfato de amônio,

ultrafiltração, cristalização, adsorção por crvão ativado e fracionamento de espuma (RODRIGUES & TEIXEIRA, 2008; DESAI & BANAT, 1997; KOSARIC, 1992).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de aumentar a produção de bio surfactantes. A otimização das condições de cultivo (como composição do meio, temperatura, pH e oxigenação) pode ser realizadas através de ferramentas computacionais e estatísticas, como por exemplo planejamento experimental (superfície resposta), lógica fuzzy, algoritmos genéticos e redes neurais. Engenharia genética também é apresentada como ferramenta promissora para a produção de bio surfactantes, tanto por modificações ou manipulações genéticas das cepas, como na auxílio da identificação de micro-organismos consideravelmente produtores (LEE *et al.* 2005; GENTRY *et al.* 2004; REIS *et al.* 2013; RAMKRISHNA, 2010).

As fontes de carbono utilizadas por micro-organismos para produção de bio surfactantes, normalmente apresentam custo elevado e podem inviabilizar economicamente a produção em larga escala. Substratos e o nutrientes do meio de cultivo equivalem a 30% dos custos de produção de bio surfactantes (RAMKRISHNA, 2010; MAKKAR *et al.* 2011).

A utilização de resíduos industriais como substratos para a produção de bio surfactante vantagens como a redução dos impactos ambientais ocasionados por estes resíduos e uma diminuição considerável nos custos produção de bio surfactantes. Essa abordagem reduz o custo para o tratamento do resíduo com o potencial de gerar lucro através da comercialização do bio surfactante. A bioconversão de resíduos em produtos de elevado valor agregado apresentam um novo fluxo de produtos para o setor industrial, com o diferencial de serem descartados em alguns processos e serem utilizados como matéria-prima em outros (KOSARIC, 1992; MAKKAR *et al.* 2011).

Muitos bio surfactantes têm sido produzidos de substratos agroindustriais renováveis e de baixo custo, que incluem derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas têm sido utilizados na produção de muitos metabólitos microbianos (REIS *et al.* 2013; RAMKRISHNA, 2010; MAKKAR *et al.* 2011). A Tabela 5 apresenta alguns substratos de baixo custo (resíduos agro-industriais), utilizados na produção de bio surfactante.

Tabela 5 – Alguns exemplos de substratos de baixo custo utilizados na produção de biossurfactantes por variados micro-organismos

Resíduo agro-industrial	Tipo de biosurfactante produzido	Micro-organismo produtor	Rendimento (g.L⁻¹)
Óleo residual de refinaria	Glicolipídeo	<i>Candida Antartica</i>	10,5
Óleo de milho	Glicolipídeo	<i>Candida bombicola</i>	4,0
Lubrificante oxidado	Glicolipídeo	<i>Bacillus megaterium</i>	4,05
Glicerol	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	1,32
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	2,2
Meleação de cana	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	2,29
Soro de leite	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	0,2
Okara	Lipopeptídeo	<i>Bacillus pumilis</i>	0,8
Suco de caju clarificado	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> LAMI005	0,64
Óleo de girassol	Lipopeptídeo	<i>Serratia marcescens</i>	2,98
Óleo de peixe	Rhaminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,0
Casca de laranja	Rhaminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,2
Óleo de soja	Rhaminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,31
Óleo de côco	Rhaminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A41	2,93
Óleo de babaçu	Soforolipídeo	<i>Candida lipolitica</i> IA 1015	11,72

Fonte: Mukherjee *et al.* 2006; MUTHUSAMY *et al.* 2008; Ramkrishna, 2010; Makkar *et al.* 2011; Sousa *et al.* 2012; Silva, 2012; Oliveira *et al.* 2013; Faria *et al.* 2013; Reis *et al.* 2013.

Considerando as inúmeras propriedades e ampla gama de aplicações que os bio surfactantes apresentam, é notória a necessidade do aprimoramento de técnicas existentes, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de produção, através de pesquisas que possibilitem a redução de custos de produção e a obtenção de elevados rendimentos são necessários para a viabilização do uso em larga escala de bio surfactante, e tornando assim, a competição com os surfactantes sintéticos mais acirrada (SOBRINHO, 2007; SILVA, 2012; REIS *et al.* 2013).

Dentro deste panorama, este trabalho teve como finalidade a avaliação da produção de bio surfactante por cepa isolada de manguezal cearense, estudar algumas propriedades e aplicações deste bioproduto, bem como verificar estratégias que visem o aumento dos rendimentos e a redução nos custos do processo de produção deste bio surfactante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e meio de manutenção e estoque

Avaliou-se o potencial de produção de biossurfactante pela cepa ICA56, previamente isolada de manguezal no município de Icapuí (Barra Grande) no estado do Ceará. Este micro-organismo foi apresentado como potencial produtor de biossurfactante por Lima (2013), por intermédio da identificação do gene *sfp*, responsável pela produção de surfactina, através de técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Esta linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e foi gentilmente cedido para a realização do presente estudo.

A manutenção da cepa foi realizada em meio APGE composto por: peptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹ e ágar 15,0 g.L⁻¹, nas respectivas concentrações. O meio APGE foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 minutos, distribuído em placas de petri e tubos rosqueados também estéreis em capela microbiológica e incubado em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 horas. A cultura foi mantida sob refrigeração a 4 °C e repicada a cada 30 dias (OLIVEIRA *et al.* 2013). A Figura 8 apresenta imagem das colônias da cepa ICA56 no meio de manutenção APGE.

Figura 8 – Colônias da cepa ICA56 em meio APGE.



3.2 Produção de biosurfactante

3.2.1 Preparação do inóculo

Na preparação do inóculo, utilizou-se meio mineral (Tabela 6), contendo glicose como fonte de carbono. O pH da solução foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH 3,0 M e HCl 3,0 M. O meio mineral foi esterilizado por 10 min à 110°C em autoclave. A composição do meio mineral (MM) foi proposta por Barreto (2011), ao estudar micro-micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biosurfactantes em solos de manguezais.

Tabela 6 - Composição do meio mineral (MM).

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10
(NH ₄)SO ₄	1,0
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	7,2
KH ₂ PO ₄	3,0
NaCl	2,7
Extrato de levedura	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6

Fonte: Barreto (2011).

O micro-organismo foi repicado em placas de petri contendo meio APGE para preparação do inóculo. A cepa foi incubada em estufa microbiológica a 30 °C por 24 horas. Após este período, foram transferidas três colônias da cultura para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de propagação de inóculo, anteriormente citado. O frasco inoculado foi incubado em agitador orbital (Tecnal - TE240, São Paulo, Brasil) a 30 °C e 150 rpm por aproximadamente 24 horas.

3.2.2 Propagação do inóculo e meio de cultivo em agitador rotatório

Com finalidade de padronização de concentração celular inicial em cada experimento, ajustou-se a densidade óptica (D.O.) do inóculo, através de diluições em

meio de cultivo estéril. A densidade óptica do inóculo foi medida em espectrofotômetro *Biochrom Libra S11* a 600 nm, utilizando o meio de cultivo estéril como branco para a análise. O meio de cultivo também foi meio mineral (Tabela 6), assim como foi para o inóculo, mas foram adicionados 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes (Tabela 7).

Tabela 7 - Composição da solução de micronutrientes.

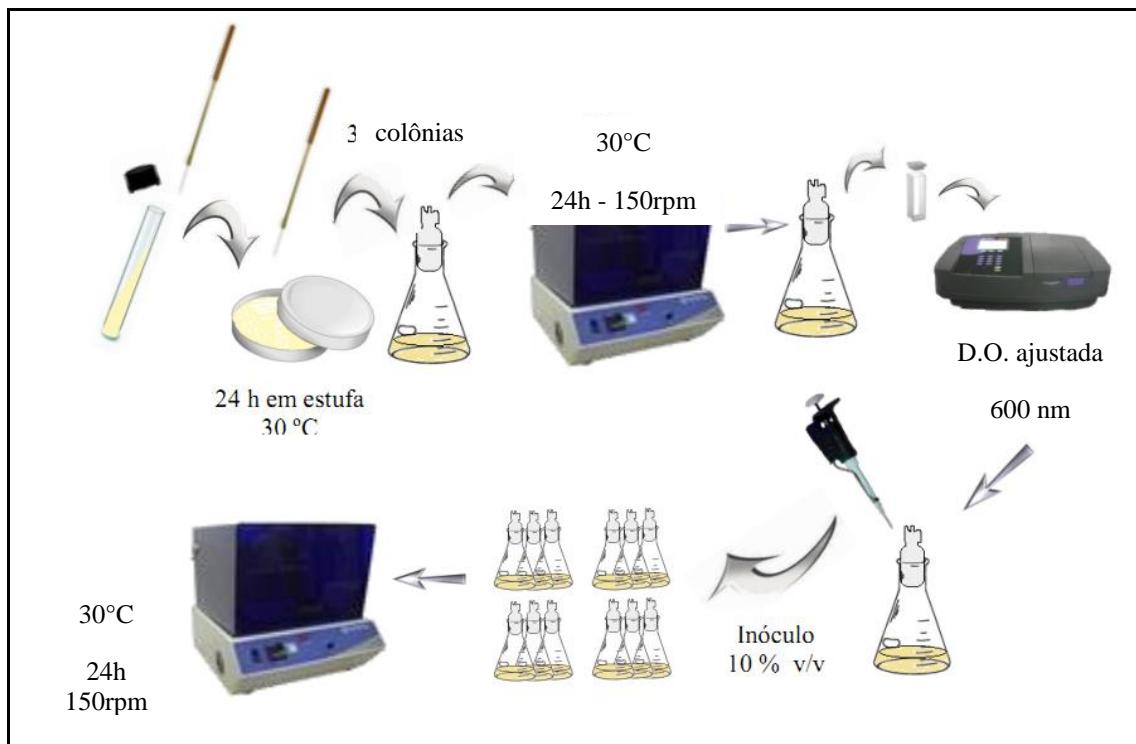
Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,95
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00
MnSO ₄ .H ₂ O	1,54
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,39
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,25
NaB ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,17
EDTA	2,50

Fonte: Morán *et al.* 2000.

Para realização dos ensaios, foram adicionados 10 % de inóculo diluído e com D.O. ajustada (aproximadamente 0,2), ao meio de cultivo, para um volume de fermentação de 100 mL, em erlenmeyers de 250 mL. Todos os meios tiveram pH ajustado para 7,0 e esterilizados a 110 °C por 10 minutos. Os frascos, contendo meio de cultivo, solução de micronutrientes e inóculo diluído, foram colocados em agitador orbital a 30 °C e 150 rpm durante um período de 72 horas, com amostragem realizadas durante este período de incubação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As amostras foram centrifugadas a 10000 g, 4 °C por 15 minutos, com finalidade de remoção das células. O sobrenadante, livre de células, foi submetido às medidas de tensão superficial, índice de emulsificação, pH, consumo de substrato e concentração de biossurfactante produzido (OLIVEIRA *et al.* 2013). A Figura 9 apresenta um esquema simplificado do cultivo aeróbio.

Figura 9 - Esquema ilustrativo do cultivo da cepa ICA56 para produção de biossurfactante em agitador orbital.



Fonte: Oliveira, 2010.

3.3 Extração e purificação do biosurfactante produzido

Partindo de uma alíquota de 20 mL do caldo fermentado livre de células, ajustou-se o pH para 2,0 com HCl 3M. A solução resultante permaneceu em repouso durante 12 horas (*overnight*), a 4 °C para que ocorresse a precipitação da surfactina. Após este tempo, o caldo fermentado acidificado foi centrifugado a 10000 g, a 4 °C por 15 minutos. Este precipitado ao ser secado em estufa (a 50° C por 24 horas) consiste no biosurfactante bruto (PEREIRA *et al.* 2013).

Para obtenção do biosurfactante semi-purificado, há a necessidade de que este bioproduto seja submetido a uma extração líquido-líquido. O precipitado, obtido da acidificação do caldo fermentado, é dissolvido em 8,0 mL de água deionizada pH 8,0 e posteriormente extraído através de partição com cloreto de metíleno (1:1). A mistura é agitada por 5 minutos e permanece em repouso por uma hora em funil de separação para que ocorra a separação das fases. A fase contendo o solvente foi recolhida em beckers após o tempo de espera. Esse procedimento é repetido três vezes. O solvente recolhido é

evaporado a temperatura ambiente (27°C) para que fique somente a surfactina no fundo e nas paredes do becker. O resultante da extração é o biossurfactante semipurificado (YEH *et al.* 2006).

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Determinação da Concentração de Biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por densidade óptica (DO) a 600 nm, em espectrofotômetro *Biochrom Libra S11*. O método baseia-se na medida de turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão, possuindo vantagens como rápida execução e utilização de equipamentos relativamente simples (ROCHA, 2007). A curva de calibração da biomassa foi obtida por técnica gravimétrica de massa seca (OLIVEIRA *et al.* 2013). O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente (27°C).

3.4.2 Determinação da concentração de substrato

As concentrações de glicose, lactose, glicerol e frutose foram determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo Waters (Modelo 2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 65°C), coluna Aminex e solução de ácido sulfúrico (5mM) em água H₂O (MiliQ) como fase móvel na vazão de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e a coluna é mantida à 65°C . O volume de injeção das amostras foi de $20\text{ }\mu\text{L}$ (CORREIA *et al.* 2013).

3.5 Caracterização das propriedades funcionais do biossurfactante produzido pela cepa ICA56 em meio mineral

3.5.1 Tensão superficial e interfacial

A atividade tensoativa do produto formado no cultivo da cepa ICA56 foi realizada pela medida das tensões superficial e interfacial, tendo em vista que um

biossurfactante eficiente apresenta elevada atividade superficial (SINGH & CAMEOTRA, 2013). Utilizou-se Tensiômetro Krüss, modelo K6, de acordo com o método descrito por Costa *et al.* (2006). O equipamento foi previamente calibrado com água e a análise foi realizada em temperatura ambiente.

Na medida da tensão superficial, utilizaram-se 30 mL da solução de biossurfactante bruto. As análises foram realizadas em triplicata. Já a tensão interfacial foi avaliada frente a algumas fontes hidrofóbicas: querosene, hexadecano, hexano e gasolina. Nesta análise, 15 mL da solução de biossurfactante bruto (250 mg.L^{-1}) são adicionados a 15 mL das fontes hidrofóbicas, e o anel do tensiômetro (Tensiômetro Krüss, modelo K6) é posicionado na interface entre os 2 líquidos. As análises foram realizadas em triplicata.

3.5.2 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Wei *et al.* (2005): 2,0 mL do meio de cultura fermentado livre de células foram colocados em tubo de ensaio, com fundo chato e foi adicionado o mesmo volume de diferentes fontes hidrofóbicas (querosene, hexadecano, óleo de soja, hexano, gasolina, biodiesel de mamona, NH₁₄₀, óleo de motor SAE 15W-40, lubrificante Lubrax 20W-40 e petróleo). Agitou-se em vórtex por dois minutos, em alta rotação. Calculou-se a razão (E_{24}) entre a altura da fase emulsificada (H_{FE}) e altura total (H_{TOTAL}) do sistema, após 24 horas. Esta análise foi realizada em triplicata. A Equação 1 apresenta o modelo matemático de cálculo do E_{24} .

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo H_{FE} a altura da fase emulsionada e H_{TOTAL} a altura total da solução.

Surfactantes químicos, como Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 foram utilizados para análise comparativa, de capacidade emulsificante, em relação ao biossurfactante produzido no presente estudo. Tanto os surfactantes sintéticos, como o biossurfactantes foram padronizados na concentração de 250 mg.L^{-1} , com finalidade de comparação.

3.5.3 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC foi determinada através do gráfico de tensão superficial *versus* concentração de biossurfactante. Foram feitas diluições sucessivas a partir solução rica em biossurfactante bruto. Essas diluições foram desde altas concentrações de biossurfactante (150 mg.L^{-1}) até a diluição infinita do biossurfactante (ausência de biossurfactante), atingindo a tensão superficial próxima à da água ($72,8 \text{ mN/m}$) na temperatura 30°C . A partir do ponto de inflexão apresentado no gráfico foi determinada a CMC (SANTA'ANNA et al. 2002).

3.5.4 Estabilidade frente variações de pH, temperatura e concentrações salinas

Alguns campos de aplicação dos biossurfactantes dependem estritamente que suas propriedades funcionais permaneçam praticamente inalteradas frente às variações ambientais em que está sujeito, tais como temperatura, pH e concentração salina (AL-BAHRY et al. 2013).

A avaliação da estabilidade das propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante bruto foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Aparna et al. (2012). Foram preparadas soluções do biossurfactante bruto então expostas às variadas de condições de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12), temperatura (4, 25, 50, 75, 100 e 121°C , por 30 minutos de exposição em mufla) e concentrações salinas (0; 2,5; 5, 10, 15 e 20% m/v de NaCl). Posteriormente foram avaliadas as tensões superficiais e o índice de emulsificação (E_{24}) em óleo de motor e óleo de soja. Estas análises foram realizadas em triplicata.

3.6 Potencial da utilização do biosurfactante produzido pela cepa ICA56 em biorremediação

3.6.1 Avaliação do potencial do biosurfactante produzido em remover metais pesados de efluente contaminado

Prepararam-se soluções-padrão de metais pesados (cobre, zinco e cromo) na concentração de 1000 ppm, em água deionizada. Estas soluções foram utilizadas como efluentes contaminados artificialmente com metais pesados. Os sais de sulfatos dos respectivos metais foram utilizados no preparo destas soluções, tendo em vista a não formação de precipitados.

O biossurfactante produzido (250 mg.L^{-1}) foi adicionado nestas soluções na finalidade de observar o potencial de remoção destes contaminantes pelo bioproduto formado. Foram realizados dois estudos simultaneamente: a influência do tempo de contato (0, 24 e 48 horas em agitador orbital a 30°C e 150 rpm) entre a solução de metais e o biossurfactante, e a avaliação da influência da adição de NaOH (0; 0,25; 1 e 2% de NaOH 0,5 M) à solução de surfactante contaminada com metais. Este estudo foi realizado de acordo com a metodologia proposta por DAHRAZMA & MULLIGAN (2007).

A técnica analítica para detecção dos metais foi espectrofotometria de absorção atômica (933 plus, GBC, Australia) com atomização da amostra em chama de acetileno e ar comprimido e, para quantificar a concentração dos metais: Cu^{2+} (324,7 nm), Zn^{2+} (213,9 nm) e Cr^{2+} (357,9 nm). Esta análise foi realizada no Lanagua (Laboratório Núcleo de Águas), Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará.

3.6.2 Avaliação do potencial do biossurfactante produzido em remover hidrocarbonetos de solo contaminado

A capacidade do biossurfactante produzido em remover hidrocarbonetos de areia contaminada foi avaliada frente a dois contaminantes: óleo de motor e petróleo (amostra da Bacia de Campos), cedida pelo Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

Avaliou-se o potencial de remoção de hidrocarbonetos do biossurfactante bruto e do caldo fermentado, segundo a metodologia descrita por Aparna *et al.* (2012). Amostras de 20g de areia (50/70 mesh) foram contaminadas com 2g de petróleo ou de óleo de motor, sendo então transferidas para Erlemeyers de 250 mL, e foram

adicionados 40 mL da solução de biossurfactante bruto, caldo fermentado livre de ou água destilada (controle). Os Erlemeyers foram conduzidos ao agitador orbital (shaker) a 150 rpm e 27 °C, por 24 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm e 15 minutos para separação da água de lavagem da areia. A quantidade de hidrocarboneto residual na areia foi quantificada gravimetricamente, como o material extraído (hidrocarbonetos) da areia com diclorometano.

Surfactantes químicos (SDS e Triton) foram utilizados para análise comparativa de eficiência em relação ao biossurfactante produzido no presente estudo, em termos de remoção hidrocarbonetos em solo contaminado. Tanto os surfactantes sintéticos, como o biossurfactantes foram padronizados na concentração de 250 mg.L⁻¹, com finalidade de comparação.

3.7 Bioensaios de toxicidade

Avaliar a toxicidade de um biossurfactante é um estudo promissor, tendo em vista sua aplicabilidade, principalmente em biorremediação *in situ*. A toxicidade do biossurfactante produzido pela cepa ICA56 foi avaliada em dois organismos: sementes de alface (*Lactuca sativa*) e microcrustáceo (*Artemia salina*). Estes organismos são amplamente utilizados em ensaios de toxicidade, devido à relativa facilidade de cultivo. Nestas análises, utilizou-se a metodologia proposta por Felix *et al.* (2012) e SOUSA *et al.* (2013).

3.7.1 Teste de germinação com *Lactuca sativa*

Utilizou-se o método de alongamento das raízes, que leva em consideração o tamanho das raízes de sementes de *Lactuca sativa* após 5 dias de incubação em estufa de germinação, expostas à diferentes concentrações e biossurfactante.

Em placas de Petri, foram colocados papéis de filtro, e estes foram umedecidos com 5 mL da solução de biossurfactante, em diferentes concentrações (500, 350, 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg.L⁻¹), sendo então adicionados 10 sementes de *Lactuca sativa* e incubadas em estufa de germinação (B.O.D.) por 5 dias, na ausência de luz e

temperatura de 24 °C. Para cada concentração, utilizaram-se três placas de petri com 10 sementes de alface. Água destilada foi utilizada como controle.

Após o período de incubação, as sementes que germinaram foram contadas e o comprimento de cada raiz foi medido. Sousa *et al.* (2013) apresenta que o Índice de Germinação (IG) é uma relação entre a quantidade de sementes que germinaram e o tamanho do crescimento da raiz, e sua rotina de cálculos está apresentado nas Equações 2, 3 e 4. O IG de uma determinada substância indica o seu nível de fitotoxicidade (TIQUIA *et al.* 1996).

$$\% GS = \left(\frac{\% GE}{\% GC} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

$$\% CR = \left(\frac{MCE}{MCC} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

$$\% IG = \frac{(\% GS) \cdot (\% CR)}{100} \quad (4)$$

Sendo:

MCE = Crescimento no extrato (média), em mm;

MCC = Crescimento no controle (média), em mm;

% GE = Porcentagem de germinação no extrato (média), adimensional;

% GC = Porcentagem de germinação no controle (média), adimensional;

% IG = Índice de germinação (média), adimensional.

3.7.2 Sobrevivências das larvas de *Artemia salina*

Realizou-se ensaio de biotoxicidade em microcrustáceo (*Artemia salina*) segundo a metodologia inicialmente proposta por Meyer *et al.* (1988), mas com as mesmas concentração de biossurfactante por Felix *et al.* (2012).

Inicialmente, preparou-se solução 3% (m/v) de sal marinho, com pH foi ajustado para faixa entre 8 e 9 pela adição de NaOH diluído (0,1 M). Os cistos de *Artemia salina*, vendidos comercialmente como alimento para peixes, foram adicionados nesta solução com aeração e iluminação constante a 25 °C por 48 horas, tendo em vista a eclosão dos ovos do microcrustáceo.

Após a eclosão dos cistos, aproximadamente 10 larvas foram transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina de biossurfactante em diferentes concentrações (750, 500, 350, 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg.L⁻¹). Após 24 horas, sobre constante iluminação e temperatura ambiente (25 °C), realizou-se a contagem das larvas que sobreviveram após exposição nas diferentes concentrações de biossurfactante. O ensaio foi realizado em triplicata e água salina foi utilizada como controle.

Esta análise permite observar a taxa de mortalidade de *Artemia salina* nas diferentes concentrações de biossurfactantes. A partir destes resultados, um modelo matemático pode se ajustar aos dados (taxa de mortalidade x concentração de biossurfactante) e então calcular a concentração de surfactante capaz de matar 50% de população (CL₅₀) do microcrustáceo *Artemia salina*. O resultado da CL₅₀ indica o nível de toxicidade de dada espécie química (SOUSA *et al.* 2013).

3.8 Cultivo em biorreator

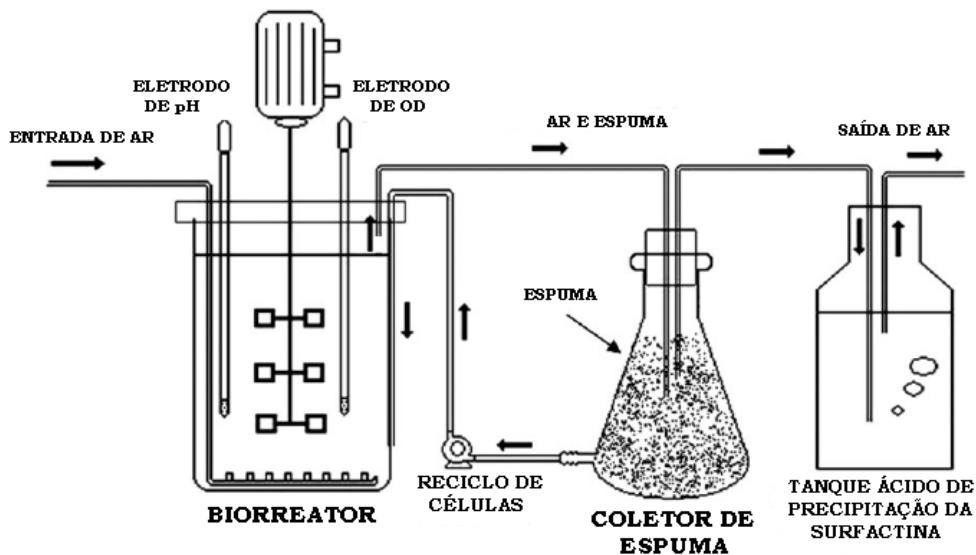
3.8.1 Configuração do biorreator

O biorreator utilizado foi um fermentador convencional Marconi constituído de uma dorna (Marconi) de 4 litros de volume útil com controle e medidor de temperatura, medidor e transmissor de pH (Orion 410A+ e o eletrodo da Mettler Toledo), medidor e transmissor de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo, modelo O2-4500), motor (Eberle modelo B63a4) e agitador mecânico e bombas peristálticas para adição de ácido e base. Além de um sistema de aquisição de dados constituído de placa de aquisição de sinais (*National Instruments*) e programação em LabVIEW (ROCHA, 2007; GIRO *et al.* 2009; SOUSA *et al.* 2012).

A Figura 9 apresenta um desenho esquemático do biorreator utilizado, bem como os acessórios que constituem o sistema de cultivo para a produção de biossurfactante: tais como a inclusão de um coletor de espuma com 2 L de volume, conectado à saída de ar do fermentador, sistema de reciclo de células, desenvolvido para retornar a porção do cultivo presente na parte inferior no coletor de espuma e sistema de recuperação de biossurfactante, desenvolvido para recuperar a porção de espuma que transbordava do coletor de espuma para um tanque de ácido. Neste tanque ácido, a

surfactina presente foi precipitada em um pH de 2,0 para a sua concentração preliminar (YEH *et al.* 2006).

Figura 10 - Configuração do biorreator utilizado.



Fonte: Giro *et. al.* (2009).

A cultura estoque da cepa ICA56 foi repicada em placa APGE e incubada a 30°C por 24 horas. Após esse período, três colônias foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio mineral. O frasco (inóculo) foi incubado em agitador a 150 rpm, 30 ° C por aproximadamente 24 horas. Após este período, o inóculo foi adicionado ao biorreator, contendo 2,7 L de meio mineral estéril, contendo glicose como fonte de carbono e suplementado com 0,1% da solução de micronutrientes.

O excesso de espuma formada no ensaio foi introduzido no coletor de espuma (Figura 10), que foi conectado a saída de gases do biorreator. O líquido acumulado no fundo do coletor de espuma foi totalmente reciclado para o fermentador através de uma bomba peristáltica, enquanto que a espuma que transbordava do coletor de espuma foi adicionada ao tanque de ácido, permitindo a precipitação da surfactina. Nenhum agente antiespumante foi adicionado durante a fermentação e o pH foi controlado para um valor de 7,0. O crescimento celular, pH, oxigênio dissolvido, concentração de substrato e concentração de surfactina foram monitorados com relação ao tempo.

3.8.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) em bioreator de bancada

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) é um dos parâmetros mais importantes a serem analisados em biorreatores aerados, pois está relacionado ao *scale up* destes sistemas.

Este coeficiente volumétrico de transferência mássica representa a resistência que a fase líquida (meio de cultivo, por exemplo) oferece à dispersão e difusão das bolhas de ar, e posteriormente à transferência de oxigênio para as células. Há certa dificuldade na estimativa do k_{LA} por intermédio de correlações, mostrando a necessidade da determinação experimental (DORAN, 1995). É importante avaliar o comportamento deste parâmetro em diferentes condições operacionais do biorreator, tais como, aeração e agitação. Foram avaliadas variadas condições de agitação (200, 250, 300 e 350 rpm) e aeração (0,5; 1; 1,5 e 2 L/min de ar) em biorreator de bancada Marconi constituído de uma dorna de 4 litros de volume útil. Estas condições operacionais são similares às apresentadas por Amani *et al.* (2010) ao estudarem a transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus subtilis* em biorreator de bancada.

O k_{LA} foi determinado pelo método dinâmico, também conhecido como “gassing-out method, utilizando-se um eletrodo de O₂ dissolvido (Mettler Toledo, modelo O₂-4500), mas sem o borbulhamento de nitrogênio gasoso. Durante as primeiras horas de cultivo (5 horas), a aeração é interrompida e a velocidade de agitação é reduzida a zero, fazendo o oxigênio dissolvido decair. Posteriormente, o fluxo de ar e a agitação são restabelecidos, o que gera o aumento na concentração de oxigênio dissolvido até um valor estacionário. Durante este processo, considera que não há variação na concentração celular do sistema. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada e registrada em intervalos de 30 segundos, através do software de aquisição LabVIEW.

Schimidell *et al.* (2001) apresenta um modelo matemático (Equação 5) resultante de um balanço de massa diferencial, durante o processo descrito anteriormente, e que permite o cálculo do k_{LA} . A integração analítica do modelo, nas

devidas condições de contorno, resulta em um equação linear, cjuo coeficiente angular é o k_{LA} .

$$\ln\left(\frac{C_o - C}{C_o - C_1}\right) = k_{LA} \cdot (t - t_1) \quad (5)$$

Na Equação 5, C representa concentração de oxigênio dissolvido, t o tempo e os subscritos indicam o momento em que o sistema de agitação e aeração são restabelecidos, e o momento no qual é observado um valor estacionário na concentração de oxigênio dissolvido.

3.9 Avaliação de substratos de baixo custo na produção de biossurfactante

Avaliaram-se substratos não convencionais para a produção de biossurfactante. As fontes de carbono avaliadas foram: glicerol, soro de leite, suco de caju clarificado e óleo de girassol. Em todos os meios de cultivo, a concentração inicial de carbono (substrato) foi padronizada para 20 g.L⁻¹ e o cultivo foi realizado em agitador orbital a 30 °C e 150 rpm, durante 48 horas. Meio mineral (Tabela 1), contendo glicose, foi utilizado com finalidade de comparação às fontes de carbono não convencionais.

3.9.1 Glicerol (MG)

Utilizou-se glicerol como fonte de carbono, segundo a metodologia proposta por Souza *et al.* (2012) que avaliaram diferentes composições de meios de cultivo contendo glicerol para produção de biossurfactante pelas cepas *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI008. A composição do meio de cultivo, em que Souza *et al.* (2012) obtiveram maior produção de biossurfactante, é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição meio mineral com glicerol.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicerol	20
K ₂ HPO ₄	13,99
KH ₂ PO ₄	6,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0
Extrato de levedura	0,4

Fonte: Souza *et al.* (2012).

3.9.2 Soro de leite (MSL)

Foi realizado tratamento ácido no soro de leite de acordo com Freitas (2013). Inicialmente, preparou-se uma solução do soro numa concentração de 50 g.L⁻¹ de lactose, sendo então aquecida a 85 °C sob agitação. Adicionou-se ácido lático até pH 4,8, e o aquecimento permaneceu constante até 90 °C. Posteriormente, o aquecimento e a agitação foram então interrompidos, e a solução, foi mantida em repouso por 15 minutos, para sedimentação das proteínas que se encontravam em solução. A solução rica em lactose foi então filtrada, diluída para 20 g.L⁻¹, e então suplementada com extrato de levedura (1,0 g.L⁻¹), como fonte de nitrogênio.

3.9.3 Suco de caju clarificado (MSCC)

Suco de caju clarificado foi utilizado como fonte de carbono, de acordo com a metodologia apresentada por Oliveira *et al.* (2013). Os açúcares redutores totais presentes no suco, glicose e frutose, foram diluídos e ajustados para concentração total inicial de 20 g.L⁻¹ no cultivo aeróbio. Foi adicionado sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) na concentração de 1 g.L⁻¹, como fonte de nitrogênio.

3.9.4 Óleo de girassol (MOG)

Utilizou-se a metodologia proposta por Vedaramam & Venkatesh (2011), ao realizarem estudo comparativo entre a produção de biossurfactante, por cepa de *Bacillus*

subtilis, em óleo de girassol, óleo de farelo de arroz e glicose. Nesta metodologia, o inóculo e o meio de cultivo apresentam composições diferentes. O inóculo é composto de Nutrient Broth (HiMedia Laboratories), um meio de cultivo comercial contendo glicose como fonte de carbono. A Tabela 9 apresenta a composição do meio de cultivo utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.

Tabela 9 – Composição meio mineral com óleo de girassol (MOG).

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Óleo de girassol	20,0
CaCl ₂	0,1
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
NaCl	0,1
Extrato de levedura	5,0
Peptona	0,7

Fonte: Vedaramam & Venkatesh (2011).

3.10 Evolução temporal da produção de biossurfactante em agitador orbital

Após avaliar fontes de carbono não convencionais pra produção de biossurfactante, realizou-se ensaio em agitador orbital utilizando as fontes de carbono que se apresentaram como promissoras na produção de biossurfactante pela cepa IC56, tendo em vista avaliar a influência do tempo de cultivo na produção.

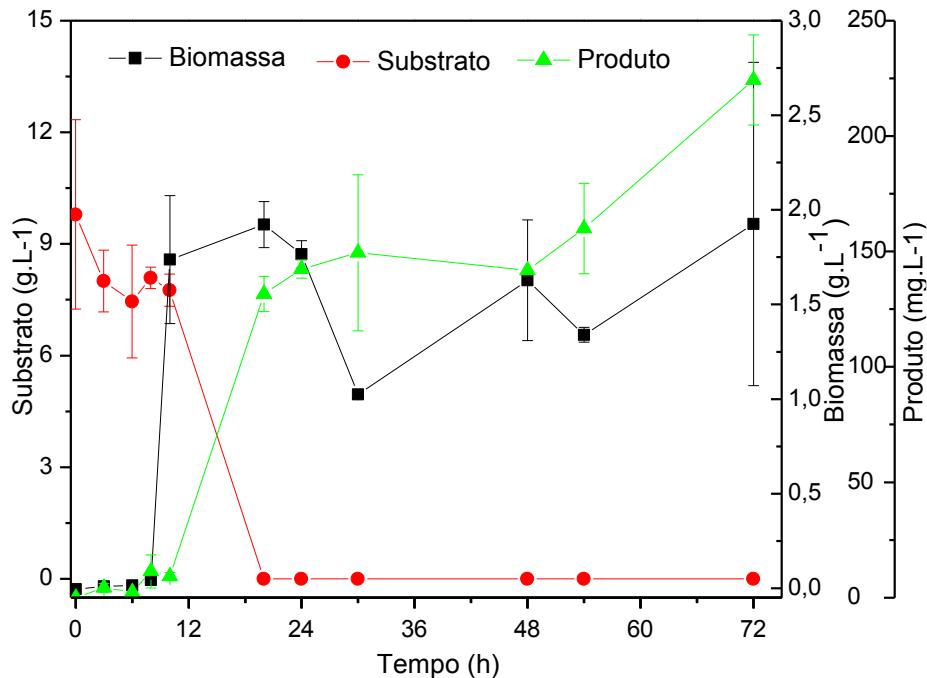
A propagação do inóculo para o meio de cultivo foi descrito no item 3.2.2. O ensaio em agitador orbital, para observar a influência do tempo na produção do biossurfactante, foi realizado em agitador orbital a 30 °C e 150 rpm durante 72 horas. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo e então submetidas às análises de biomassa, consumo de substrato, formação de produto e tensão superficial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Evolução temporal da produção de biossurfactante pela cepa ICA56 em meio mineral em agitador orbital

Inicialmente, foi realizado ensaio em agitador orbital para avaliar a produção de biossurfactante em meio mineral pela cepa ICA56. A Figura 11 apresenta os resultados de consumo de substrato, formação de produto, bem como crescimento celular durante o cultivo da cepa ICA56. Meio mineral (Tabela 6) foi utilizado para o cultivo da cepa

Figura 11 - Produção de biossurfactante pela cepa ICA56 em meio mineral em agitador orbital, 150 rpm e 30°C: Crescimento celular (■), consumo de substrato(●) e formação de produto (▲).



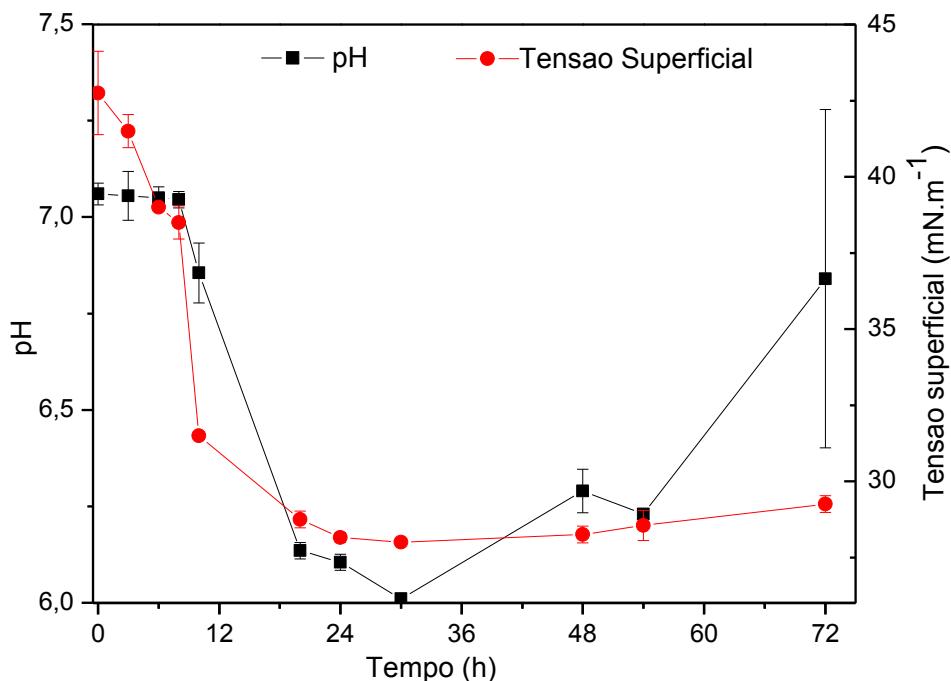
Em 10 horas de cultivo, observou-se o início da fase estacionária do crescimento celular, período próximo em que todo o substrato foi consumido. Já a maior produção de surfactina (aproximadamente 220 mg.L⁻¹) ocorreu em 72 horas de fermentação.

Em termos de produção de biossurfactante, obteve-se um resultado inferior a alguns trabalhos científicos recentemente publicados. Al-Wahaibi *et al.* (2013) ao

estudarem a aplicação de surfactina, produzida por cepa de *Bacillus subtilis*, na recuperação melhorada de petróleo obtiveram produção de aproximadamente 500 mg.L⁻¹ de biossurfactante, utilizando meio de cultivo similar ao do presente estudo. Varadavenkatesan & Murty (2013) relataram produção aproximadamente 640 mg.L⁻¹ de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos por cepa de *Bacillus sp.* Coutté *et al.* (2013) produziram cerca de 750 mg.L⁻¹ de surfactina, ao propor um processo integrando de produção, extração e purificação de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis*. Já Al-Bahry *et al.* (2013) obtiveram cerca de 2290 mg.L⁻¹ de surfactina ao utilizar melão de tâmara como fonte de carbono. Oliveira *et al.* (2013), ao utilizar cepa de *Bacillus subtilis* e concentração inicial de açúcares redutores totais (glicose e frutose), similar à utilizada de glicose no presente estudo, produziram somente 30 mg.L⁻¹ de surfactina.

Durante o cultivo da cepa ICA56, foi realizada a análise da tensão superficial do caldo fermentado, como uma medida indireta da quantidade e eficiência do biossurfactante produzido, pois estas biomoléculas apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial de líquidos (COUTTÉ *et al.* 2013; AL-WAHAIBI *et al.* 2013; GUDIÑA *et al.* 2010). A Figura 12 apresenta o comportamento da tensão superficial e do pH durante o cultivo.

Figura 12 – Tensão superficial (●) e pH (■) durante cultivo de cepa ICA56 em meio mineral em agitador orbital, 150 rpm e 30°C.



Observou-se uma redução da tensão superficial do caldo fermentado livre de células de 44 para 28 mN.m⁻¹ (aproximadamente 35 %), mostrando a eficiência do tensoativo produzido. Este redução apresentou-se similar ao observado por Giro *et al.* (2009), que utilizaram meio mineral para cultivar *Bacillus subtilis* LAMI005, mas obtiveram uma redução da tensão superficial de aproximadamente 40,3 % em 48 horas de fermentação.

A menor tensão obtida no ensaio foi de aproximadamente 28 mN.m⁻¹, valor bastante satisfatório já que a surfactina apresenta a característica de reduzir a tensão da água de 72 para 27 mN.m⁻¹ (BARROS *et al.*, 2008).

O pH manteve-se relativamente estável, na faixa entre 6,5 e 7,0. Resultado diferente ao observado por Rocha *et al.* (2008), que obtiveram redução de pH ao estudar a produção de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* LAMI008, sendo atingido valores de pH variando de 5,2 a 6,0. Já Reis *et al.* (2004) observaram o mesmo comportamento do presente trabalho, quando estudaram a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633 em material de baixo custo (cana-de-açúcar, óleo de soja, dentre outros) como meio de cultura.

Valores consideravelmente ácidos durante o cultivo podem mascarar os resultados da produção de biossurfactante, pois a acidificação do meio causa a precipitação da surfactina, causando possível perda desse produto. Barros *et al.* (2008) ao estudarem a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira, observaram que em valores de pH abaixo de 4,0, ocorre aumento no valor da tensão superficial de uma solução rica em surfactante, já que nessa condição, parte do tensoativo que se encontrava solubilizado no meio, precipitaria, fornecendo assim valores não tão confiáveis. Devido à presença dos ácidos glutâmico e aspártico (aminoácidos) na estrutura da surfactina (PEYPOUX *et al.* 1999), o contato com HCl, ou outro ácido, pode causar protonação da cadeia lateral destes aminoácidos, tornando a surfactina insolúvel em meio aquoso. Este fato não foi observado no ensaio realizado, uma vez que o pH não atingiu valores próximos a 4,0 durante o cultivo. Kim *et al.* (1997), Oliveira *et al.* (2013), Sousa *et al.* (2012), Al-Bahry *et al.* (2013) e Al-Wahaibi *et al.* (2013) também obtiveram resultados semelhantes.

4.2 Estudo das propriedades tensoativas do biosurfactante produzido

A eficácia de um tensoativo é definida através da capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial, que são definidas como a medida de energia livre de superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior de um líquido para uma superfície ou para outro líquido (BEZERRA, 2012; MULLIGAN *et al.* 2005). Devido à presença de um surfactante, uma quantidade menor de energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície, e assim, a tensão superficial, ou interfacial é reduzida (PIROLLO, 2006).

A análise da tensão superficial e interfacial de uma solução rica em biosurfactante é uma medida indireta da quantidade e qualidade deste bioproduto, pois estas biomoléculas apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos (NITSHIKE *et al.* 2002, ROCHA *et al.* 2006, OLIVEIRA *et al.* 2013). A capacidade de reduzir a tensão superficial da água para valores abaixo de 35 mN.m^{-1} é um dos critérios utilizados para a seleção de micro-organismos produtores de biosurfactantes (MULLINGAN *et al.* 2005).

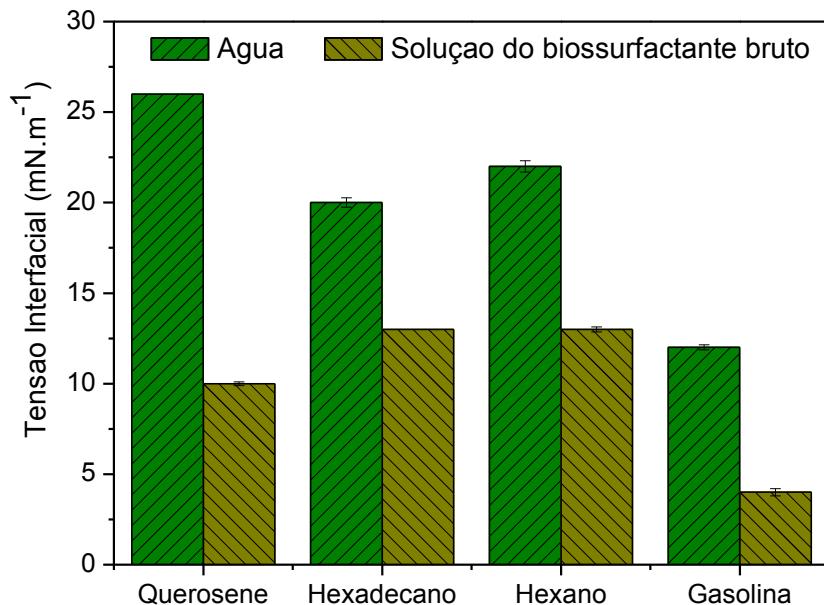
A adição do biosurfactante bruto, produzido pela cepa ICA56 em meio mineral foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN.m^{-1} , representando uma redução de 54%, mostrando a eficiência do bioproduto formado com um tensoativo em potencial. A surfactina apresenta a característica de reduzir a tensão da água de 72 mN.m^{-1} , para valores próximos a 27 mN.m^{-1} , sendo este último valor, a menor tensão obtida por esse tensoativo (BARROS *et al.* 2008). O resultado obtido no presente estudo é similar aos apresentados por Cooper *et al.* (1981); Peypoux *et al.* (1999); Sousa *et al.* (2012) e Al-Wahaibi *et al.* (2013). Nitschke *et al.* (2006) ao avaliar alguns resíduos agroindustriais como substrato para produção de biosurfactantes por *Bacillus sp.*, obtiveram redução média na tensão superficial de apenas 21,5%. Giro *et al.* (2009) obtiveram redução de 40,3 %, durante o cultivo para produção de surfactina em suco de caju clarificado. Estes resultados mostram que a biomolécula em estudo pode ser apresentada como um tensoativo em potencial.

Biosurfactantes também apresentam a capacidade de reduzir tensão interfacial entre líquidos. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um

filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes e biosurfactantes (NITSCHIKE *et al.* 2002).

A Figura 13 apresenta os valores obtidos na medida da tensão interfacial de uma solução aquosa de biosurfactante bruto e algumas fontes hidrofóbicas (querosene, hexadecano, hexano e gasolina). A adição de surfactina na fase aquosa do sistema causou redução na tensão interfacial de 63% para querosene, 35% para hexadecano, 45% para hexano e 70% para gasolina, o que evidencia a eficiência do biosurfactante produzido.

Figura 13 - Tensão interfacial do biosurfactante bruto produzido pela cepa ICA56 em meio mineral frente ao querosene, hexadecano, hexano e gasolina.



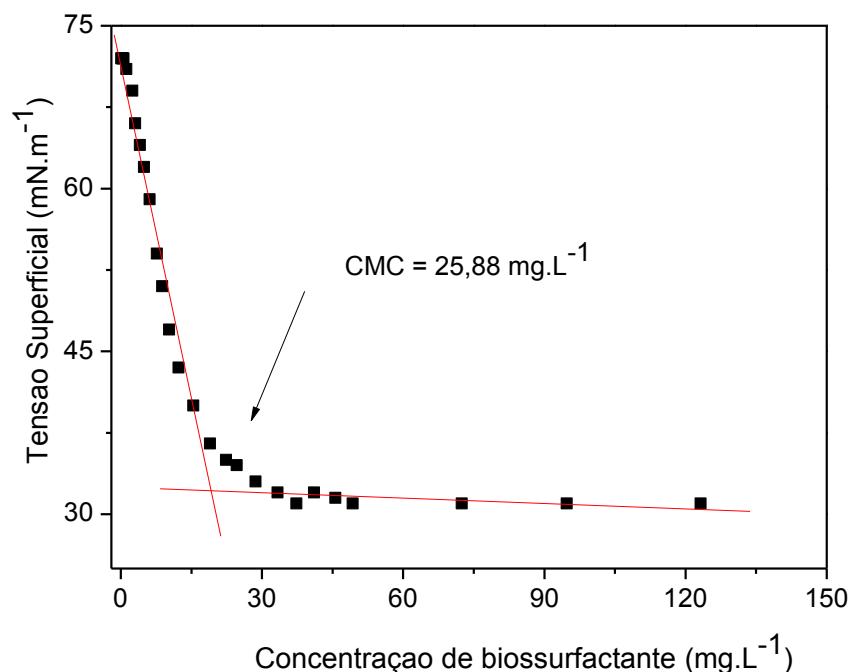
Amani *et al.* (2010) observaram resultados similares referente à ação da surfactina em reduzir a tensão interfacial de alguns hidrocarbonetos em meio aquoso, ao estudar a produção de biosurfactantes por diferentes micro-organismos, dentre eles, *Bacillus subtilis*, produtor de surfactina.

Outra propriedade tensoativa dos biosurfactantes é a Concentração Micelar Crítica (CMC). A concentração micelar crítica (CMC) pode ser entendida como a menor concentração do tensoativo onde ocorre a formação de micelas por saturação das interfaces do meio, sendo essa uma das principais características dessa classe de substância, característica tal que direciona o tipo de aplicação de cada surfactante ou

biossurfactante e os incluem em diversas aplicações industriais (BARROS *et al.* 2008), sendo a quantificação da CMC uma importante análise da eficiência de um tensoativo.

A Figura 14 apresenta as diluições realizadas em uma solução inicial rica em biossurfactante bruto e a medida da tensão em cada diluição. A CMC é calculada no ponto de inflexão apresentado na Figura 14. A CMC obtida para a surfactina produzida no presente trabalho foi de $25,88 \text{ mg.L}^{-1}$.

Figura 14 - Concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante obtido no cultivo da cepa de ICA56 em meio mineral.



Fox & Bala (2000) apresenta que a CMC da surfactina pode varia de 10 a 100 mg.L^{-1} . Segundo Christofi & Ivshina (2002) quanto menor é o valor da CMC, mais eficiente é um surfactante.

A Tabela 10 apresenta o valor de CMC da surfactina obtida por outros autores, e mostram que o resultado obtido no presente estudo é satisfatório, ao compará-los.

Tabela 10 – Valores de Concentração Micelar crítica (CMC) da surfactina obtidos em outros estudos.

CMC (mg.L⁻¹)	Referência
25	Cooper <i>et al.</i> (1981)
40	Kim <i>et al.</i> (1997)
20	Peypoux <i>et al.</i> (1999)
78,4	Rosen (2004)
11	Reis <i>et al.</i> (2004)
11	Sen & Swaminathan (2004)
37	Barros <i>et al.</i> (2008)
32	Bueno <i>et al.</i> (2010)
63	Sousa <i>et al.</i> (2012)

O resultado também foi satisfatório ao ser comparado à surfactina padrão comercial (Sigma - 98% de pureza), cuja CMC é de aproximadamente 13 mg.L⁻¹ (BUGAY, 2009).

Christofi & Ivshina (2002) estudaram comparativamente a CMC de alguns surfactantes sintéticos e alguns bio surfactantes e observaram que os sintéticos apresentam elevados valores de CMC (Tween 20 - 2120 mg.L⁻¹, Bromato de Cetiltrimetilamonio - 1300 mg.L⁻¹ e SDS – 2330 mg.L⁻¹), quando comparados à CMC dos bio surfactantes.

A CMC da surfactina produzida também é inferior a de outros bio surfactantes, como é o caso dos rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentam CMC de aproximadamente 48,3 mg·L⁻¹ (CAMILIOS NETO *et al.* 2009).

Bugay (2009), ao estudar a produção e caracterização de bio surfactantes produzidos por cepas de *Bacillus sp.*, propõe que a CMC da surfactina padrão

(comercial) é de 23 mg·L⁻¹, resultando bastante similar ao obtido no presente estudo. Bugay (2009) também apresenta que a CMC dos biossurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus sp.* é bem menor ao ser comparada com a dos surfactantes químicos, ficando clara a importância do aprimoramento da produção de biossurfactantes e cita o exemplo do dodecil sulfato de sódio (SDS), surfactante químico comumente utilizado na indústria, e que apresenta uma CMC de 2333 mg·L⁻¹ ou seja, cerca de 430 vezes maior que a do biosurfactante produzido por cepas de *Bacillus* analisada em seu estudo.

Um valor de CMC baixo indica que pouca quantidade de biosurfactante é necessária para obter elevada eficiência desta espécie química como tensoativo (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.* 2011). A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que o biosurfactante produzido pela cepa ICA56 apresenta grande atividade superficial (tensoativo) e CMC baixa, propriedades estas o que o caracterizam como um bom tensoativo.

4.3 Avaliação da capacidade emulsificante do bioproduto formado

A avaliação da capacidade emulsificante de um biosurfactante é uma análise promissora para a aplicabilidade deste bioproduto, principalmente para a indústria petrolífera e na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos (NITSCHKE & PASTORE, 2006). A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que micro-organismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes. Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A capacidade emulsificante do biosurfactante bruto em formar emulsões estáveis foi avaliada frente às seguintes fontes hidrofóbicas: querosene, hexadecano, óleo de soja, hexano, gasolina, biodiesel de mamona, NH₁₄₀, óleo de motor SAE 15W-40, lubrificante Lubrax 20W-40 e petróleo. A Tabela 11 apresenta os valores obtidos de índice de emulsificação (E_{24}) e a Figura 15 ilustra imagens de algumas das emulsões formadas entre a solução do biosurfactante bruto e algumas fontes hidrofóbicas.

Tabela 11 - Índice de emulsificação (E_{24}) do biosurfactante produzido pela cepa ICA56, em meio mineral, frente algumas fontes hidrofobicas.

Fonte hidrofóbica	$E_{24}(\%)$
Óleo de Motor 15W-20	$77,9 \pm 0,01$
Lubrificante Lubrax 20W-40	$68,3 \pm 0,08$
Óleo de Soja	$66,7 \pm 0,00$
Hexadecano	$64,5 \pm 0,00$
Querosene	$61,9 \pm 0,07$
Hexano	$61,7 \pm 0,02$
Biodiesel de Mamona	$61,5 \pm 0,03$
Gasolina	$46,4 \pm 0,00$
Petróleo	N.F.*
NH_{140}	N.F.*

*N.F.: não formou emulsão estável em 24 horas de análise

Figura 15 - Emulsão formada entre solução rica em biosurfactante produzido pela cepa ICA56 e algumas fontes hidrofóbicas.



Segundo Bezerra (2012), um critério a ser analisado para considerar um emulsificante como eficiente é apresentar capacidade de formar emulsão com hidrocarbonetos e se manter acima de 50% (E_{24}) em 24 horas de análise. Como pode ser observado na Tabela 11, o biossurfactante produzido foi capaz de produzir emulsões estáveis, e com E_{24} maior do que 50 %, na maioria das fontes hidrofóbicas avaliadas. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos ao utilizar óleo de motor (77,9%), lubrificante Lubrax 20W-40 (68,3%) e óleo de soja (66,7%) e esses resultados são satisfatórios quando comparados a alguns resultados publicados por outros autores.

Nitschke & Pastore (2006), ao estudarem a produção de biossurfactante por cultivo de *Bacillus subtilis* em manipueira, obtiveram E_{24} em alguns hidrocarbonetos: 66,6 % (hexano), 70,4 % (querosene), 69 % (hexadecano) e 74 % (óleo de soja). Pyria & Usharani (2009) ao realizarem estudo comparativo entre o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, relataram que a surfactina produzida foi capaz de emulsificar querosene e óleo vegetal, com índices de emulsificação de 34% e 43%, respectivamente.

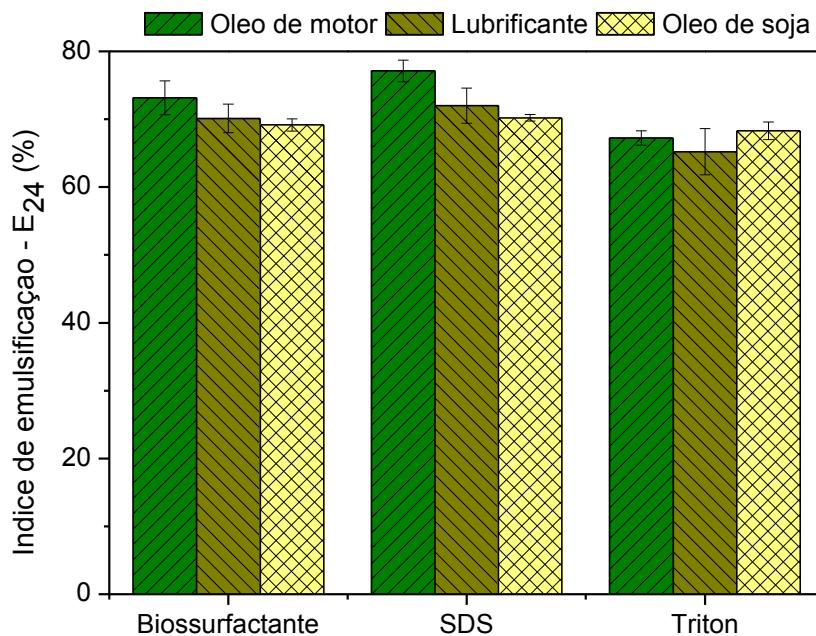
França (2011) observou o mesmo comportamento de elevado índice de emulsificação em óleo de motor 15W-20 (72,5%) para surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005, e justificou este resultado pelo reduzido diâmetro das gostas do sistema emulsionado, ao realizar análise microscópica da emulsão formada.

Sriram *et al.* (2011), ao estudarem a ação antimicrobiana dos lipopeptídeos produzidos por cepa de *Bacillus sp.*, obtiveram E_{24} de 80,36% em óleo de motor e 50,47 % em óleos vegetais. Slivinski *et al.* (2012) observaram que ao avaliar a produção de surfactina por *Bacillus pumilus*, a surfactina produzida foi capaz de emulsificar alguns hidrocarbonetos, com os seguintes valores de E_{24} : 52% (óleo de soja), 82% (óleo de motor), 20 % (hexano) e 53% (gasolina). Al-Wahaibi *et al.* (2013) ao estudarem a aplicação de surfactina, produzida por cepa de *Bacillus subtilis*, e aplicação na recuperação melhorada de petróleo, obtiveram E_{24} de aproximadamente 54% em hexadecano, 48% em hexano e também não observou a formação de emulsão estável entre solução aquosa do biossurfactante produzido e petróleo.

Simultaneamente à avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante produzido, realizou-se um estudo comparativo entre sua eficiência emulsificante e dois surfactantes químicos (Triton e SDS) amplamente utilizados na

indústria. A Figura 16 apresenta os valores de índice de emulsificação entre o bio surfactante produzido, triton e SDS em óleo de motor, lubrificante e óleo de soja.

Figura 16 – Índice de emulsificação do bio surfactante produzida no cultivo da cepa ICA56, em meio mineral, comparado aos obtidos com surfactantes sintéticos (SDS e Triton X-100) em óleo de motor, lubrificante e óleo de soja.



Observa-se na Figura 16 que o bio surfactante produzido no presente estudo mostrou capacidade emulsificante bastante similar à apresentada pelos surfactantes químicos, principalmente quando comparado aos resultados do SDS. Nas 3 fontes hidrofóbicas avaliadas, foi observado bastante similaridade entre os índices de emulsificação da surfactina com o SDS. O maior índice de emulsificação (E_{24}) observado neste estudo foi de aproximadamente 77 % de óleo de motor em SDS, valor este bem próximo do que foi observado para a emulsão de óleo de motor na surfactina que foi de 73%. Em lubrificante, a emulsão apresentou um comportamento mais equivalente ainda entre o bio surfactante (68%) e o SDS (69%). Já o triton demonstrou ser um emulsificante menos eficiente, quando comparado ao SDS e o bio surfactante produzido no cultivo da cepa ICA56.

Vaz *et al.* (2012) ao estudarem a produção de bio surfactante por cepa de *Bacillus subtilis* isolada de ambiente contaminado com petróleo, também realizou um

estudo comparativo entre o bio surfactante produzido e alguns surfactantes químicos comerciais, quanto às suas capacidade emulsificante. Vaz *et al.* (2012) obtiveram os maiores índices de emulsificação (E_{24}) no bio surfactante e em um dos surfactantes químicos avaliados (Findet), sendo estes valores bem similares para todas as fontes hidrofóbicas analisadas. A surfactina produzida por estes pesquisadores demonstrou ser um emulsificante mais eficiente do que alguns surfactantes comerciais, como Glupone 650 e Dodecilbenzenosulfato de sódio (LAS).

Segundo Nitschke & Pastore (2002), os bio surfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniónicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de bio surfactante.

O bio surfactante produzido mostrou-se capaz de produzir emulsão estável na maioria das fontes hidrofóbicas e com E_{24} acima de 50%, mostrando ser um eficiente emulsificante, e com eficiência emulsificante similar ou mesmo superior aos surfactantes químicos analisados.

4.4 Estabilidade das propriedades tensoativas e emulsificantes frente a variações de pH, temperatura e força iônica (% NaCl)

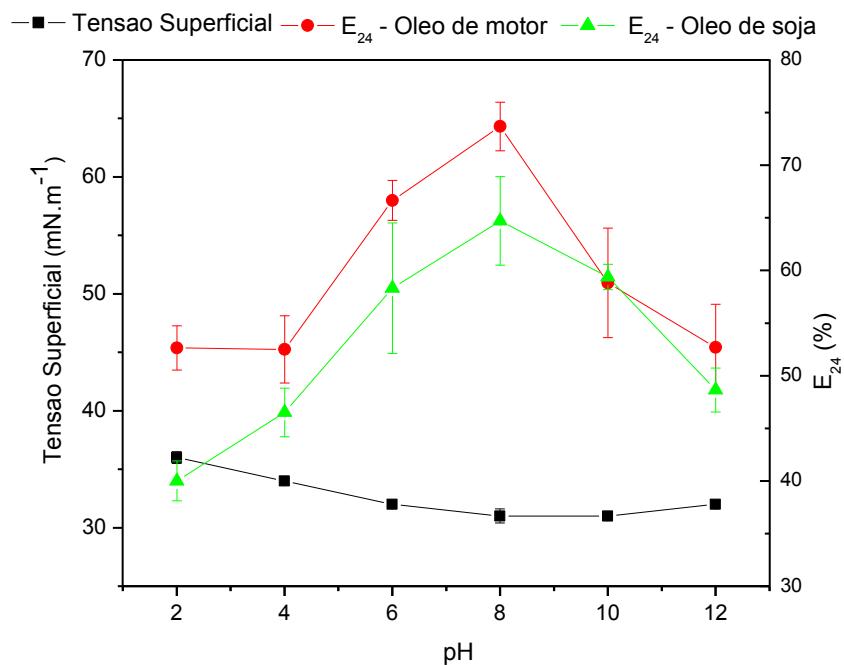
Segundo Vaz *et al.* (2012), os bio surfactantes apresentam propriedades que os caracterizam como potenciais insumos em diversos setores e processos industriais. Estes processos estão normalmente associados a condições extremas (tais como pH, temperatura ou salinidade), sendo então necessária uma avaliação da estabilidade desses bio surfactantes frente à essas condições.

A estabilidade do bio surfactante produzido, frente as variações de pH, temperatura e força iônica foi avaliada por intermédio da análise da estabilidade da emulsão formada em óleo de motor e em óleo de soja, bem como da atividade superficial (tensão superficial).

4.4.1 Efeito do pH

A Figura 17 apresenta o efeito da variação do pH nas propriedades tensoativas e emulsificantes do bio surfactante produzido pela cepa ICA56.

Figura 17 – Efeito da variação do pH no Índice de Emulsificação na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biosurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.



Observa-se na Figura 17 que o biosurfactante produzido apresentou menor valores de tensão superficial e maiores resultados de índice de emulsificação na faixa de pH de 6,0 a 10,0. No pH 8,0 o biosurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 31 mN.m⁻¹, representando um redução de aproximadamente 57%. Este resultado nesta faixa de pH era esperado, tendo em vista as características do biosurfactante produzido, pois em pH mais próximos à neutralidade (pH 7,0), a surfactina permanece solubilizada em solução, mantendo suas propriedades tensoativas e emulsificantes. Apesar de que na faixa mais próxima da neutralidade, em todos os valores de pH estudados, a tensão superficial, permaneceu de certa forma constante e inferior a 40 mN.m⁻¹.

Em óleo de motor, observou-se que em todas as faixas de pH analisados, os índices de emulsificação foram superiores a 50 %, indicando a eficiência do tensoativo produzido. Este resultado de estabilidade na emulsão formada também foi observado em óleo de soja, exceto para os pH de 2,0 e 4,0.

Valores consideravelmente ácidos do meio causam a precipitação da surfactina, causando possível perda desse produto. Devido à presença dos ácidos glutâmico e aspártico (aminoácidos) na estrutura da surfactina, o contato com HCl, ou outro ácido, causa a protonação da cadeia lateral destes aminoácidos, tornando a surfactina insolúvel em meio aquoso (GUDINA *et al.* 2010).

Antunes (2007) observou que valores acentuadamente ácidos de pH podem causar alterações nas forças eletrostáticas envolvidas na formação de emulsões, o que pode acarretar a coalescência (separação) das fases envolvidas.

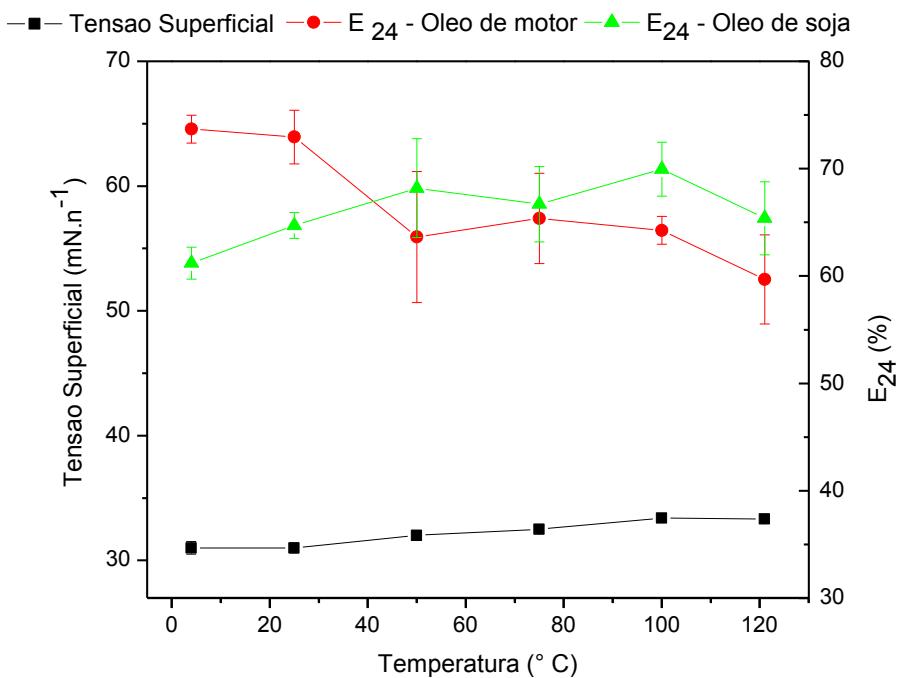
A variação do pH no meio pode também afetar a estrutura e o tamanho das micelas formadas entre o bio surfactante e o sistema água-óleo. Knoblich *et al.* (1995) observaram que a variação do pH alterou o tamanho e o formato das micelas produzidas pela surfactina. Nos valores de pH mais próximos a neutralidade, a micela apresenta uma estrutura globular e elipsoidal. Já em condições mais alcalinas, a estrutura passava para um formato globular e clíndrico e com tamanho maior do que em pH mais ácidos ou neutros. Um tamanho de micela maior pode agregar uma maior quantidade material de um sistema água-oleo.

Os resultados de estabilidade do bio surfactante, frente a variações de pH, foram semelhantes aos reportados por Al-Bahry *et al.* (2013) e Al-Wahaibi *et al.* (2013), que observaram maior estabilidade da surfactina produzida na faixa de pH de 6,0 a 12,0, apesar de que nos valores ácidos de pH o bio surfactante ainda seja eficiente.

4.4.2 Efeito da temperatura

A fim de se analisar o efeito da temperatura nas propriedades tensoativas e emulsificantes do bio surfactante em estudo, alíquotas de solução do bio surfactante bruto foram expostos à diferentes temperaturas (4, 25, 50, 75, 100 e 121 °C) por 30 minutos. A Figura 18 apresenta o efeito da variação da temperatura no índice de emulsificação (E_{24}) na emulsão formada em óleo de motor e óleo de soja, e na tensão superficial de solução rica em bio surfactante bruto.

Figura 18 – Efeito da variação da temperatura no Índice de Emulsificação na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.



A Figura 18 mostra que apesar do tratamento térmico na solução rica em biossurfactante bruto, tanto as propriedades tensoativas como emulsificantes não apresentaram mudanças significativas nas temperaturas de 4 a 120 °C.

A tensão superficial da solução de biossurfactante permaneceu na faixa entre 31 e 33 mN.m⁻¹, mostrando a estabilidade da atividade superficial do tensoativo produzido frente as variações de temperaturas analisadas. As emulsões analisadas em óleo de motor e óleo de soja também apresentaram estabilidade apresentando valores de índice de emulsificação entre 60 e 75% para a faixa de temperatura analisada.

Diversos estudos confirmam a estabilidade das propriedades dos biossurfactantes quando submetidos a condições extremas de temperatura. Joshi *et al.* (2008) reportaram que os biossurfactantes produzido por 4 cepas de *Bacillus sp.* permaneceram com suas propriedades estáveis, quando submetidos à 80 °C durante nove dias. Vaz *et al.* (2012) também observaram a estabilidade do biossurfactante produzido por cepas de *Bacillus sp.*, isolada de ambiente contaminado com petróleo, quando submetidos a condições extremas de temperatura. Al-Bahry *et al.* (2013) observaram que a tensão superficial, de uma solução rica em surfactina, não apresentou

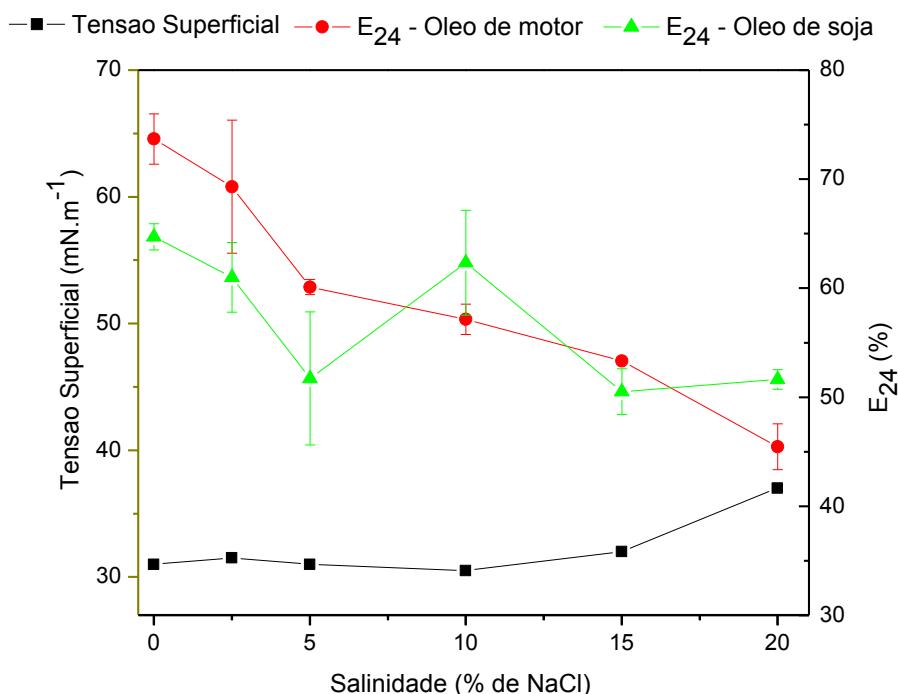
variações significantes quando submetia a temperaturas de 40 a 160 °C por 20 minutos. Al-Wahaibi *et al.* (2013) observaram que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* B30 permaneceu como um tensoativo eficiente mesmo quando submetido a temperaturas próximas de 160 °C.

Segundo Khopade *et al.* (2012), a estabilidade térmica de um biossurfactante é um resultado interessante no que se relaciona a aplicabilidade de um produto. Em alguns setores industriais a estabilidade térmica é um fator crucial, tais como nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, em que há necessidade de estilização de certos produtos por tratamento térmico.

4.4.3 Efeito da força iônica

O efeito da adição de NaCl (a de 0 a 20 % m/v) à uma solução rica em biossurfactante também foi analisado, em termos de tensão superficial e índice de emulsificação. A Figura 19 apresenta os resultados deste estudo.

Figura 19 – Efeito da variação da força iônica no Índice de Emulsificação na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) do biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.



Observou-se que os índices de emulsificação apresentaram um decréscimo à medida que a concentração salina foi aumentada. Entretanto a maioria dos valores de E₂₄ permaneceu superior a 50 %, indicando a eficiência do bio surfactante. A emulsão formada em óleo de soja apresentou maior estabilidade, frente à variação de força iônica, do que a formada em óleo de motor. Na maior concentração analisada (20% m/v) a emulsão formada em óleo de motor apresentou índice de emulsificação de aproximadamente 45%, apresentando indícios que para esta concentração salina, o bio surfactante analisado não apresente a mesma eficiência como emulsificante, do que nas outras analisadas.

Já a tensão superficial não apresentou variação tão significativa, permanecendo estável em uma faixa entre 31 e 32 mN.m⁻¹, com exceção para a concentração de 20 % de NaCl que apresentou tensão de 37 mN.m⁻¹. Este resultado reforça a possibilidade que para esta concentração salina, a eficiência do bio surfactante seja levemente reduzida. Apesar do suave aumento na tensão superficial na concentração de NaCl mais elevada, o bio surfactante produzido ainda foi capaz de reduzir cerca de 48% na tensão superficial. Até 10% de salinidade, foi observada variação insignificante nas propriedades tensoativas do bio surfactante produzido. Os bio surfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl enquanto que concentrações salina de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Knoblich *et al.* (1995) observaram que a adição de sal a solução de surfactina provoca uma mudança no tamanho da micela formada. Elevadas concentrações salinas podem diminuir consideravelmente o tamanho da micela e afetar as propriedade funcionais deste bio surfactante.

Shaw (1970) propõe que os sais iônicos formam interações íon-dipolo com a água. Estas interações são mais fortes do que as formadas entre o sal e a fase gasosa (ar), e estas moléculas evitam a interface ar/sistema aquoso, gerando um aumento na tensão superficial de uma solução.

Segundo Mohamed *et al.* (2003), com o aumento da concentração salina, também é observado um aumento na energia livre do sistema. Então as emulsões formadas não são termodinamicamente estáveis, proporcionando um aumento na taxa de coalescência das gostas e posterior separação de fases.

Al-Bahry *et al.* (2013) reportaram que o biosurfactante produzido pro cepas de *Bacillus sp.* apresentou estabilidade tensoativa até 4% de salinidade, valor inferior ao observado no presente estudo. Al-Wahaibi *et al.* (2013) observaram que a surfactina produzida apresentou estabilidade quando submetida até concentração salina de 5 % (NaCl). Felix (2012) também observou tensão de 37 mN.m⁻¹ pra solução rica em surfactina com 20% de NaCl (m/v) e que o biosurfactante permaneceu estável até 10% de salinidade, ao avaliar a produção de surfactina pelo cultivo da cepa de *Bacillus subtilis* LAMI005 em suco de caju clarificado.

Khopade *et al.* (2012) propõem que biosurfactantes que suportem até 10% de salinidade apresentam viabilidade à utilização na biorremediação de ambientes marinhos.

4.5 Aplicação do biosurfactante produzido na remoção de hidrocarbonetos em areia contaminada

A atual dependência do petróleo e seus derivados são acompanhados com o risco ambiental envolvido no seu processo produtivo, refino, transporte e armazenamento e distribuição de derivados. Estão envolvidos riscos de derramamentos acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados (CRAPEZ *et al.* 2002). Aparna *et al.* (2012) apontam a aplicação de biosurfactantes como uma das técnicas mais promissoras para remoção de hidrocarbonetos.

Avaliou-se o potencial de remoção de petróleo e óleo de motor, em areia contaminada, pelo caldo fermentado (livre de células), obtido no cultivo da cepa ICA56, e pela solução de biosurfactante bruto, sendo água destilada utilizada como controle. Comparativamente dois surfactantes químicos (sintéticos) foram também avaliados. A Tabela 12 apresenta a quantidade (%) de hidrocarbonetos removidos da areia contaminada, após tratamento com biosurfactante, surfactantes químicos e água.

Tabela 12 – Potencial de remoção de hidrocarbonetos de areia contaminada com petróleo e óleo de motor, por diferentes tratamentos.

Tratamento	Petróleo removido (%)	Óleo de motor removido (%)
Caldo fermentado	85 ± 2,06	90,8 ± 0,6
Biossurfactante bruto	76,89 ± 3,2	88,6 ± 0,9
Água destilada	36,1 ± 1,1	33,12 ± 2,8
SDS	81,2 ± 0,5	79,2 ± 1,3
Triton X-100	76,1 ± 2,1	70,4 ± 0,4

Observa-se na Tabela 12 que o tratamento com biossurfactante foi o responsável pelo maior potencial de remoção tanto de petróleo como de óleo de motor, de 85% e 90,8 %, respectivamente. A solução de biossurfactante bruto apresentou um potencial de remoção de hidrocarbonetos, levemente menor, quando comparado ao caldo fermentado livre de células. Este fato pode ser justificado por uma possível perda material de biossurfactante, durante as operações unitárias com finalidade da obtenção da surfactina bruta.

Entretanto, as diferenças observadas entre o potencial de remoção do caldo fermentado e da solução de biossurfactante bruto são bastante pequenas, mostrando o potencial de aplicabilidade do biossurfactante produzido em biorremediação. Este resultado é bem interessante, pois mostra que a aplicabilidade do biossurfactante produzido não está associada necessariamente a processos de purificação, gerando redução de custos ao processo. A Figura 20 apresenta imagens da areia contaminada com petróleo após tratamento com biossurfactante, surfactantes químicos e água e a Figura 21 mostra a solução de lavagem utilizada no tratamento da areia contaminada.

Figura 20 – Na imagem superior: areia limpa sem contaminação. Imagem inferior: areia contaminada com petróleo após tratamento com água, caldo fermentado e solução do biossurfactante bruto.

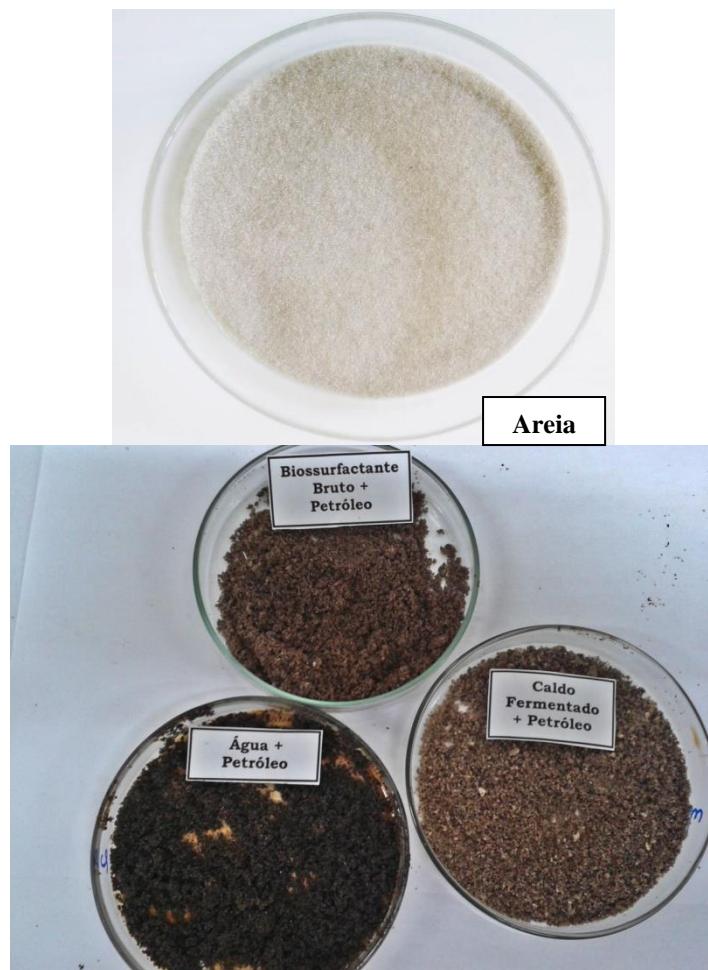


Figura 21 – Imagem da solução de lavagem após utilização no tratamento de areia contaminada com óleo de motor e petróleo.



Observa-se na Figura 20 que a areia contaminada após tratamento com o caldo fermentado apresentou uma coloração mais clara, mostrando que o petróleo que estava presente foi removido. Na Figura 21, observa-se que o caldo fermentado adquiriu uma coloração bem mais escura do que as outras soluções, mostrando que parte do petróleo que estava contaminando a areia foi transferida para esta solução. A areia contaminada após tratamento com água destilada apresentou uma coloração bem mais escura, mostrando que a quantidade de petróleo residual presente ainda é elevada. Água destilada removeu somente 36% de óleo cru presente na areia. Os surfactantes químicos (SDS e Triton X-100) apresentaram potencial de remoção de petróleo e óleo de motor, mas estes valores foram levemente inferiores aos observados pela aplicação do biosurfactante, mostrando a eficácia do bioproduto em estudo. O surfactante sintético SDS apresentou potencial de remoção de hidrocarbonetos superior ao Triton X-100, o que pode ser explicado pelo menor valor de CMC apresentado pelo SDS (BUGAY, 2009). Os biosurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biosurfactante (NITSHICKE & PASTORE, 2002).

Joshi *et al.* (2008) observaram que os biosurfactantes produzido por cepas de *Bacillus sp.* foram capazes de remover 30% de óleo em solo contaminado. Lai *et al.* (2009) observaram que biosurfactantes (ramnolipídeos e surfactina) são mais eficientes na remoção de hidrocarbonetos de solo do que surfactantes químicos (tween-80 e triton x-100). Jain *et al.* (2012) estudaram a eficiência de ramnolipídeos (*Pseudomonas aeroginsa*) e surfactina (*Bacillus subtilis*), quanto a remoção de petróleo, e compararam os resultados com surfactantes químicos (tween-80, SDBS e Alfoterra 5PO-145). Estes autores observaram os seguintes resultados, quanto à remoção de petróleo em coluna de vidro contendo areia contaminada: surfactina (68%), ramnolipídeos (57%), tween-80 (52%), SDBS (51%) e alfoterra (55%). Estes resultados mostram que os biosurfactantes foram mais eficientes do que os surfactantes sintéticos, assim como foi observado no presente estudo.

Luna *et al.* (2013) observaram que o biosurfactante produzido por *Candida sphaerica* foi capaz de remover aproximadamente 90% de óleo de motor de solo contaminado. Silva *et al.* (2013), ao estudarem a produção de biosurfactante em substratos de baixo custo, reportaram que o tensoativo produzido por *Pseudomonas sp.*

apresentou potencial de remoção de óleo de motor de 80%. Nalini & Parthasarathi (2013), ao estudar a produção de biossurfactante por *Serratia rubidaea*, observaram que o biossurfactante produzido foi capaz de remover 85% de óleo em areia contaminada, e que o caldo fermentado livre de células foi mais eficiente na remoção de hidrocarbonetos do que SDS e água, com 60% e 46%, respectivamente. Pereira *et al.* (2013) também observaram que o caldo fermentado de *Bacillus subtilis* foi mais eficientes do que alguns surfactantes químicos comerciais, como *Enordet* e *Petrostep*, quanto à remoção de hidrocarbonetos em solo contaminado.

Biossurfactantes apresentam vantagens sobre os surfactantes químicos, sendo mais eficientes e ecologicamente mais corretos, pois removem hidrocarbonetos contaminantes de um solo sem modificar a natureza química daquele ambiente (LAI *et al.* 2009).

4.6 Aplicação do biossurfactante produzido na remoção de metais pesados

As contaminações por hidrocarbonetos e metais são grandes preocupações ambientais, mas poucas tecnologias são capazes de amenizar os efeitos destes dois contaminantes, simultaneamente. Íons metálicos não são biodegradáveis e apresentam elevada toxicidade. Assim, a remediação de hidrocarbonetos de baixa volatilidade e metais é apresentada como uma grande preocupação ambiental (MULLIGAN *et al.* 2001). De acordo com Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011), a remoção de metais pesados por biossurfactantes ocorre possivelmente por complexação da forma livre do metal em solução, agindo como um quelante.

A presença de diferentes grupos funcionais de diferentes polaridades nas moléculas de biossurfactante acarreta uma interação molecular com a carga dos metais, atuando como um agente quelante, possibilitando a sua remoção de um solo ou efluente contaminado (MULLIGAN *et al.* 1999; PACWA-PLOCINICZAK *et al.* 2011).

Avaliou-se o potencial do biossurfactante produzido, no cultivo da cepa ICA56, quanto á remoção de metais pesados (cobre, cromo e zinco) e os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Potencial de remoção de metais pesados pelo bioassfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.

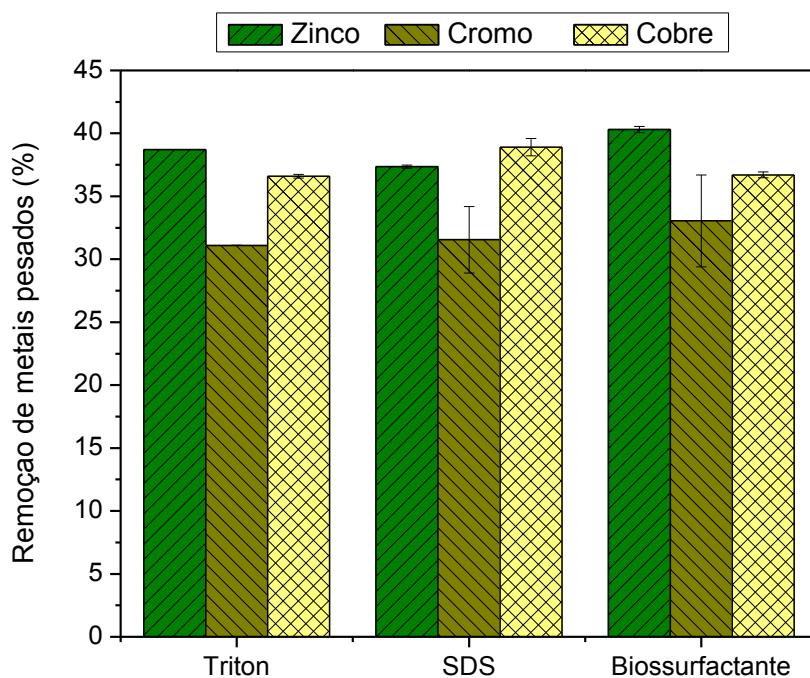
Amostra	Remoção de Cu²⁺ (%)	Remoção de Cr³⁺ (%)	Remoção de Zn²⁺ (%)
0 h	29 ± 0,20	35 ± 0,19	34 ± 0,26
24 h	60 ± 0,14	34 ± 0,61	33,9 ± 0,14
48 h	86 ± 0,24	36 ± 0,39	39 ± 0,36
24 h + 0,25% NaOH	56 ± 0,51	37 ± 0,21	33 ± 0,21
24 h + 1% NaOH	100 ± 0,0	100 ± 0,0	99,12 ± 0,5,
24 h + 2% NaOH	100 ± 0,0	100 ± 0,0	98,97 ± 0,37

Observa-se na Tabela 13 que os maiores potencias de remoção de metais pesados ocorreram ao se adicionar NaOH ao sistema, algo previsto pelas propriedades do bioassfactante produzido, pois em pH mais próximos à neutralidade (pH 7,0), a surfactina permanece solubilizada em solução. A adição de NaOH foi mais eficiente do que um aumento no tempo de contato entre o bioassfactante e os metais pesados. Este comportamento foi bastante similar ao observado por Mulligan *et al.* (2001), ao avaliar a remoção de íon metálicos contaminantes de solo por surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*. Singh & Cameotra (2013) também observaram que o pH influencia diretamente na ação quelante da surfactina, em remover metais pesados em efluente ou em solo contaminado.

Mulligan *et al.* (1999) mostraram que a surfactina foi capaz de remover íons de cobre e zinco de um solo contaminado com hidrocarbonetos (petróleo). Observou-se, nesses estudos, que a remoção de zinco e cobre do solo contaminado foi superior 70%, e a remoção de hidrocarbonetos foi de 50%. Os resultados também mostraram que a ação da surfactina na remoção de metais pode ser otimizada se estiver associada com 1% de NaOH. Estes autores também observaram que a surfactina produzida pode ser reutilizada (soluço de lavagem) até cinco vezes, que ainda sim apresente potencial para remoção de metais pesados. Gnanamani *et al.* (2010) estudaram a biorremediação de Cr (VI), utilizando o bioassfactante produzido por *Bac. sp.* MTCC 5514. Foi observado que a biorremediação aconteceu em 2 etapas: a redução de Cr (VI) para Cr (III), que é menos tóxico, por meio de metabólitos extracelulares produzidos pela cepa e interação entre o bioassfactante, produzido durante o cultivo, e Cr (III).

Simultaneamente à avaliação do potencial de remoção de metais pesados pelo bioassurfactante, realizou-se um estudo comparativo entre sua eficiência como agente quelante e dois surfactantes químicos (Triton X-100 e SDS) amplamente utilizados na indústria. A Figura 22 apresenta a remoção (%) de metais pesados (cobre, cromo e zinco) ao serem utilizados SDS, Triton X-100 e o bioassurfactante produzido produzido pela cepa ICA56 em meio mineral.

Figura 22 – Remoção de metais pesados pelo bioassurfactante produzida no cultivo da cepa ICA56, em meio mineral, comparado a surfactantes sintéticos (SDS e Triton X-100).



Observa-se na Figura 22 que o bioassurfactante em estudo apresentou potencial de remoção de metais pesados similar ou mesmo superior quando comparado aos surfactantes químicos analisados. Nos metais analisados, observou-se que o bioassurfactante apresentou eficiência similar ao Triton X-100. O maior potencial de remoção foi observado no bioassurfactante, quando aplicado a efluente contaminado com zinco, sendo a remoção em torno de 41 %.

Maity *et al.* (2013) realizaram estudo similar, e utilizarem surfactina e surfactantes sintéticos tipo saponinas, e obtiveram remoção de metais pesados inferiores ao presente estudo. Estes autores, ao utilizar surfactina, removeram somente 17% e 24%

de íons de cobre e zinco em solução, respectivamente. Quando a solução de surfactina foi adicionada de saponinas, ocorreu um aumento no potencial de remoção para 47% para íons cobre e 40% para íons de zinco quando comparadas a eficiência dos surfactantes químicos.

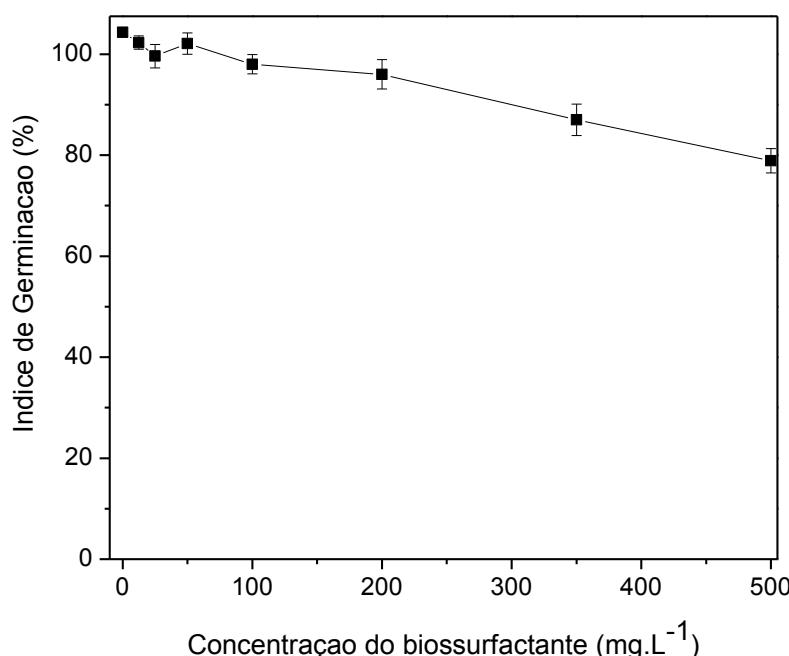
4.7 Bioensaios toxicológicos

4.7.1 Teste de germinação com *Lactuca sativa*

Avaliou-se a toxicidade do bio surfactante produzido no cultivo da cepa ICA56 frente a sementes de *Lactuca sativa* (alface). Poucos estudos têm sido realizados com finalidade de verificar a toxicidade destes bioproductos, tendo em vista sua aplicabilidade (SOUZA SOBRINHO *et al.* 2013).

A Figura 23 apresenta o Índice de Germinação (IG) da *Lactuca sativa* para cada concentração do bio surfactante analisado. Este índice leva em conta tanto o crescimento das raízes, como a porcentagem de germinação das sementes em cada concentração de bio surfactante (LUNA *et al.* 2013).

Figura 23 – Índice de Germinação da espécie de alface *Lactuca sativa* em diferentes concentrações do bio surfactante produzido no cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.



Observa-se na Figura 23 que os índices de germinação para as concentrações de biossurfactante de 0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 350 e 500 mg.L⁻¹ foram de 104,3; 102,3; 99,6; 102,1; 98; 96; 87 e 78,9, respectivamente. Nota-se que nas concentrações inferiores a 500 mg. L⁻¹, o biossurfactante produzido não apresentou efeito inibitório no crescimento das raízes de *Lactuca sativa*, pois apresentaram índice de germinação superior a 80%. Tiqua *et al.* (1996) consideram que índice de germinação de 80% é um indicador de ausência de fitotoxicidade. Na concentração de 500 mg.L⁻¹ de biossurfactante, foi observado índice de germinação de 78,9%, indicando que para esta concentração o bioproduto estudado pode apresentar efeito inibitório no crescimento das sementes de alface. É possível afirmar que para o biossurfactante produzido não apresentou influencia no índice de germinação das sementes de *Lactuca sativa*.

Resultado bastante semelhante foi observado por Felix (2012), ao avaliar a produção de surfactina por cepa isolada de tanque de tratamento de esgoto, cultivada em suco de caju clarificado.

Millioli *et al.* (2009) observaram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* não afetou o índice de germinação de sementes de alface em concentrações inferiores a 8 mg de biossurfactante/ 1 g de solo. Estes autores também realizaram um estudo comparativo entre a toxicidade (em sementes de alface e de tomateiro) de alguns surfactantes químicos (SDS, Tween-80, Biosolve e Biononex) e biossurfactante (ramnolipídios), e observaram que os surfactantes de origem microbiana apresentam toxicidade bastante inferior aos surfactantes sintéticos comerciais. Luna *et al.* (2013), ao estudarem a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* utilizando resíduos industriais como substrato, reportaram que o biossurfactante produzido não afetou o crescimento de sementes de alguns vegetais: *Brassica oleracea* (couve) *Solanum gilo* (jiló) e *Lactuca sativa* (alface). Qazi *et al.* (2013) observaram que, para baixas concentrações, o biossurfactante produzido por *Fusarium sp.* não apresentou efeito inibitório sobre as sementes de mostarda e pode ser apresentado como seguro para aplicações ambientais.

Singh & Cameotra (2013) ao estudarem a produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos por *Bacillus subtilis*, observaram que a surfactina produzida não afetou o crescimento de raízes de mostarda. Estes autores observaram que a germinação das sementes, na presença de biossurfactante, apresentou apenas uma leve diferença,

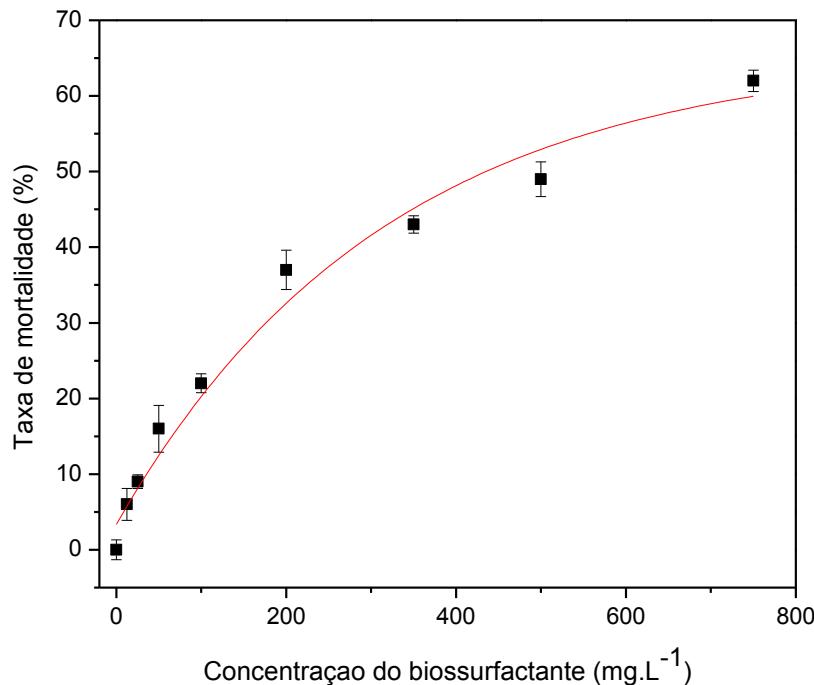
quando comparada aos aditivos agrícolas normalmente utilizadas neste tipo de plantio, classificando a surfactina como biologicamente compatível ao meio ambiente.

4.7.2 Teste de mortalidade do microcrustáceo da espécie *Artemia salina*

O derramamento de petróleo e seus derivados em ambientes marinhos é atualmente um dos principais problemas ambientais. O petróleo tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de diversas técnicas físicas e químicas para eliminá-lo das águas ou, ao menos, reduzir seus efeitos sobre o ecossistema. Segundo Nishicke & Pastore (2002), os bioassfactantes têm recebido grande atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais ou sintéticos; além disto, sua baixa toxicidade amplia o seu campo de aplicabilidade.

Avaliou-se a toxicidade do bioassfactante produzido no microcrustáceo *Artemia salina*, tendo em vista uma análise da toxicidade deste bioproduto em organismos aquáticos para caso de uma aplicação em ecossistema marinho. *Artemia salina* é um organismo-padrão comumente utilizado em testes de ecotoxicologia, pela facilidade de manutenção em laboratório, além de requerer condições simples de cultivo e ciclo de vida curto. Soluções de bioassfactante bruto nas concentrações de 0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 350, 500 e 750 mg.L⁻¹, foram utilizadas neste ensaio. Realizou-se uma regressão não linear nestes dados experimentais, no intuito de obtenção um modelo que estime a CL₅₀ (concentração de uma determinada espécie química que causa efeito agudo de letalidade ou imobilidade em 50% dos organismos de uma população). A obtenção da CL₅₀ permite a classificação de uma espécie química quanto à toxicidade. A Figura 24 apresenta a taxa de mortalidade do microcrustáceo para cada concentração de bioassfactante analisado e a Equação 6 apresenta o modelo de regressão não linear que se ajustou aos dados experimentais ($R^2 = 0,984$).

Figura 24 – Taxa de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* em diferentes concentrações do biossurfactante produzido no cultivo da cepa ICA56 em meio mineral (ajuste exponencial dos dados).



$$y = 103,24 \cdot e^{\frac{x}{28,86}} - 118,21 \quad (6)$$

Dolabella (1997) classifica as espécies químicas quanto à toxicidade em microcrustáceos (*Artemia salina*) de acordo com o valor da CL₅₀. Segundo este autor, uma substância é considerada altamente tóxica quando CL₅₀ é menor do que 80 mg.L⁻¹, moderadamente tóxica se o valor de CL₅₀ estiver entre 80 e 250 mg.L⁻¹ e para valores acima de 250 mg.L⁻¹, a substância pode ser considerada atóxica.

A partir do modelo, ajustado para os dados de taxa de mortalidade dos microcrustáceos e dose de biosurfactante, obtém-se a CL₅₀ do biosurfactante produzido como sendo de aproximadamente 465,6 mg.L⁻¹. Segundo a classificação de Dolabella (1997) o biosurfactante produzido pela cepa ICA56 não apresentou efeitos tóxicos ao organismo estudado, o que pode viabilizar sua aplicabilidade em ecossistemas marinhos. Observa-se na Figura 24, que nas doses (12,5; 25 e 50 mg.L⁻¹) próximas à concentração micelar crítica (25 mg.L⁻¹) do biosurfactante produzido, a taxa de mortalidade da *Artemia salina* foi baixa, permanecendo inferior a 15%. Este

resultado mostra que mesmo em concentrações baixas, o biossurfactante será eficiente, como tensoativo, e possivelmente não causará efeito tóxico significativo a alguns organismos.

Felix (2012) também observou a ausência de toxicidade na surfactina produzida por cepa de *Bacillus subtilis*, relatando CL₅₀ de 612,57 mg.L⁻¹. Silva *et al.* (2013) ao estudarem a produção de biossurfactante em substratos de baixo custo, reportaram que o tensoativo produzido por *Pseudomonas sp.* não apresentou considerável toxicidade em *Artemia salina*. Estes autores observaram que efeito inibitório no crescimento do microcrustáceo foi somente a concentrações elevadas de tensoativo, mas estas doses estavam bastante acima da CMC do biossurfactante estudado. Luna *et al.* (2013) também observaram resultados semelhantes aos estudar a toxicidade do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*. Estes resultados também mostram a baixa ou mesmo ausência de toxicidade dos biossurfactantes.

Já os surfactantes químicos são prejudiciais ao meio ambiente, pois são tóxicos e não apresentam biodegradabilidade (PIRRÔLO, 2006). Alguns estudos apresentam a toxicidade de alguns surfactantes sintéticos, comumente utilizados industrialmente. Liwarska-Bizukojc *et al.* (2005) ao estudarem a toxicidade de alguns surfactantes sinéticos em microcrustáceos do tipo *Artemia salina*, observaram que os surfactantes aniônicos (SDS, SDBS e APE) são acentuadamente tóxicos ($10 < \text{CL}_{50} < 100 \text{ mg.L}^{-1}$) e que os não iônicos (AES e AE) podem ser extremamente tóxicos ($\text{CL}_{50} < 10 \text{ mg.L}^{-1}$). Li (2008) também observou que os surfactantes sintéticos apresentam elevada toxicidade, e que podem ser um risco ambiental, mostrando que surfactantes químicos como SDS e Triton X-100, apresentam CL₅₀ de 0,36 e 11,18 mg.L⁻¹. Baixas concentrações de surfactantes químicos podem causar sérios danos ao ecossistema onde está sendo aplicado.

Dehghan-Noudeh *et al.* (2005) realizaram um estudo comparativo entre a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, e alguns surfactantes químicos (SDS, TTAB, BC e HTAB) no que se refere à capacidade de ruptura de células vermelhas (hemólise de eritrócitos). Estes autores observaram que os surfactantes sintéticos apresentam uma habilidade de ruptura de eritrócitos bem mais elevada do que os biossurfactante analisado, mostrando que os surfactantes químicos apresentam maior toxicidade sobre células animais do que os biossurfactantes.

Hwang *et al.* (2009) estudaram a toxicidade da surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, em organismos maiores: ratos. Estes autores forneceram ração com diferentes doses de surfactina durante 28 dias para ratos e verificaram taxa de mortalidade, os efeitos da surfactina sofre o peso dos animais, bem como realizaram análises físico-químicas (necropsia) nas vísceras (pulmão, coração, glândulas, dentre outros) dos organismos, tendo em vista observarem se a surfactina apresentava algum efeito negativo sobre algum órgão ou sistema vital dos organismos. Estes autores observaram que não houve morte dos s em nenhuma das doses analisadas sendo que o único efeito relatado foi que nas doses mais elevadas de surfactina ocorreu uma leve redução no peso dos animais. Hwang *et al.* (2009) relataram que a análise físico-química das vísceras mostrou que a surfactina não apresentou nenhum efeito tóxico sobre os animais. Não foi observada nenhuma zona de necrose nos órgãos e sistemas vitais analisados, exceto algumas manchas nas veias hepáticas nas doses extremamente elevadas de surfactina (2000 mg de surfactina/kg do organismo).

A baixa toxicidade dos bio surfactantes pode ser justificada por suas propriedades tensoativas serem extremamente suaves, o que pode implicar em elevada compatibilidade biológica. A estrutura polimérica e a composição de grupos polifuncionais fazem com que os bio surfactantes possuam uma polaridade menor que os surfactantes químicos. Desta maneira, as micelas formadas pelos bio surfactantes apresentam menor carga eletrostática, e maior compatibilidade com membranas biológicas, quando comparadas aos surfactantes sintéticos (FELIX, 2012).

4.8 Avaliação do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{LA}) na produção de bio surfactante.

Em geral, o aumento de escala de um processo está condicionado a ensaios iniciais em bancadas de laboratório, para que sejam, em seguida, testados em escala semi-piloto e piloto. Após estes estudos, dá-se início a produção em escala industrial (SAKATO, 1997).

O critério de aumento de escala em alguns sistemas de cultivo aeróbio está relacionado em manter a similaridade entre os coeficientes volumétricos de oxigênio (k_{LA}). Este coeficiente de convecção de massa de oxigênio está relacionado a diversos fatores, como a velocidade de agitação (nível de mistura) variação de viscosidade do

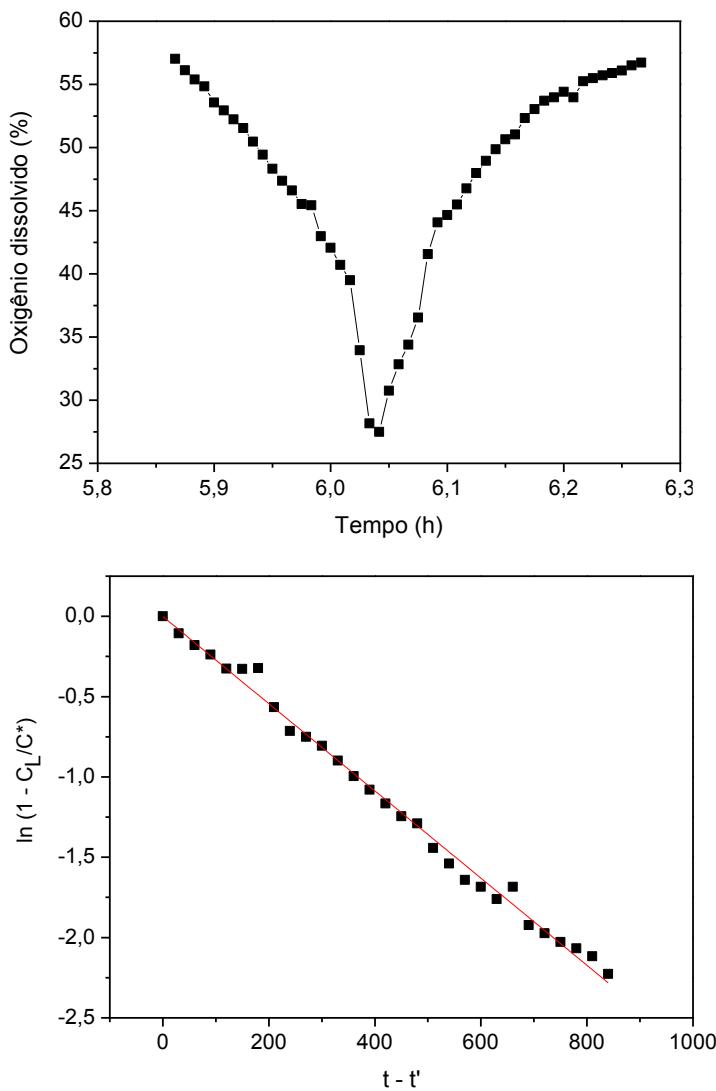
meio, temperatura e taxa de aeração do sistema. A obtenção de elevadas concentrações de produto desejado, na maioria dos casos, depende da quantidade de oxigênio que está sendo transferido para o meio líquido, daí surge o interesse em estudo do coeficiente de transferência de oxigênio em sistemas agitados e aerados.

A proposta desta etapa do estudo está relacionada à avaliação da influência da transferência de oxigênio para a cepa ICA56 em biorreator de bancada de 4L. Tem-se em vista a otimização do processo de produção de biossurfactante, por intermédio da variação de condições operacionais do processo: agitação (rpm) e aeração ($L \cdot min^{-1}$ de oxigênio). Outros estudos já publicados discutem o efeito desses parâmetros isoladamente para aumentar produção e concentração de surfactina em cepas de *Bacillus sp.* (NAJAFI *et al.* 2010; WINTERBURN *et al.* 2011) sendo então a avaliação destas variáveis combinadas um estudo promissor.

Neste estudo, realizaram-se cultivos aeróbios em biorreator de bancada (4L) com aproximadamente 10 g.L^{-1} de glicose (Meio Mineral) para análise da influência da concentração de oxigênio, através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) na produção de surfactina. Foram avaliados os efeitos da agitação (200, 250, 300 e 350 rpm) e aeração (0,5; 1; 1,5 e 2 $L \cdot min^{-1}$ de oxigênio) na produção de biossurfactante.

O k_{LA} foi determinado pelo método indireto, mas sem o borbulhamento de nitrogênio. A Figura 25 apresenta o perfil temporal do oxigênio dissolvido para a condição de 200 rpm e 1 vvm, bem como a linearização da curva proposto pela Equação 4. Esta foi a metodologia utilizada para calcular o k_{LA} em todos os ensaios realizados.

Figura 25 – Cultivo para produção de biossurfactante - Saturação de oxigênio em função do tempo para vazão de $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de O_2 e agitação de 200 rpm. (O gráfico superior é equivalente oxigênio dissolvido durante o período que k_{LA} foi determinado, e o inferior representa os dados para o cálculo do k_{LA} linearizados pelo modelo proposto).



Nesta condição operacional, foi obtido k_{LA} de aproximadamente $10,44 \text{ h}^{-1}$. Os valores de k_{LA} , para esta condição, foi inferior do que o encontrado por Amani *et al.* (2010) no cultivo de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactantes. Apesar dos valores obtidos apresentaram valores diferentes, a mesma ordem de grandeza foi observada. A Tabela 14 apresenta os resultados de k_{LA} , biomassa, formação de produto e tensão superficial para todas as condições avaliadas.

Tabela 14 – Influência da variação na agitação e aeração, de biorreator de bancada para cultivo da cepa ICA56, na biomassa, formação de produto, tensão superficial e coeficiente de transferência de oxigênio em 24 horas de cultivo.

Agitação (rpm)	Aeração (L/min)	K_{La} (h⁻¹)	X_{máx} (g.L⁻¹)	P_{máx} (mg.L⁻¹)	Tensão Superficial (mN/m)
200	0,5	7,704	2,4	22,53	46
200	1	10,44	3,1	115,97	30
200	1,5	12,564	1,8	15,02	41
200	2	24,95	1,7	14,03	45
250	0,5	9,64	2,42	56,52	38
250	1	13,65	1,62	11,54	42,5
250	1,5	19,66	3,26	12,84	40
250	2	26,33	1,28	11,96	38
300	0,5	23,87	2,79	13,93	40
300	1	25,32	3,52	11,1	42
300	1,5	27,2	2,18	13,71	36
300	2	29,3	2,56	23,99	46
350	0,5	24,5	1,64	11,26	49
350	1	29,6	1,21	10,94	43
350	1,5	30,2	0,71	42,74	38,8
350	2	38,6	0,57	21,22	41

Estes resultados foram similares ao observados por Amani *et al.* (2010) ao realizarem estudo semelhante com cepa de *Bacillus subtilis*, visando a utilização da surfactina produzida em recuperação melhorada de petróleo. Entretanto, AMANI *et al.* 2010 obtiveram maiores concentrações de biossurfactante.

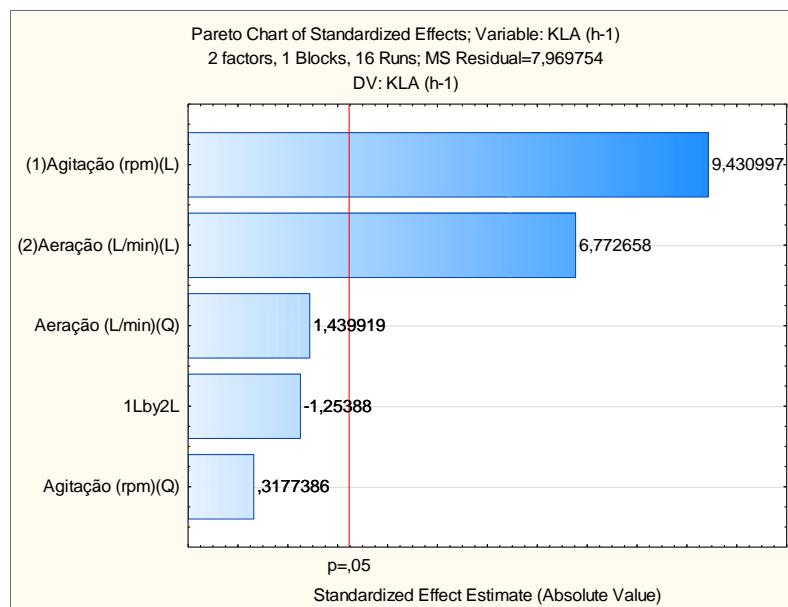
A redução na tensão superficial reflete a produção de biossurfactante, mostrando sua eficiência como tensoativo. Na condição de 200 rpm e 1 L.min⁻¹ de oxigênio ocorreu a maior produção de surfactina (116 mg.L⁻¹) e consequentemente a maior redução na tensão superficial, aproximadamente 55%.

Com base nos resultados obtidos foi gerado o diagrama de Pareto, tendo em vista analisar os efeitos isolados e combinados da agitação e aeração, e superfície resposta, visando à obtenção da condição operacional ótima para produção de

biossurfactante pelo cultivo da cepa ICA56. As variáveis foram significativas para o processo com nível de significância de 95 % para variáveis isoladas e a interação entre elas.

Por meio do diagrama de Pareto (Figura 26) pode-se verificar que as variáveis isoladamente (ajuste linear) apresentaram um efeito mais significativo sobre transferência (k_{LA}) de oxigênio do que combinadas entre si.

Figura 26 – Diagrama de Pareto mostrando a contribuição da agitação e aeração na transferência de oxigênio (k_{LA}) durante o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.



Observa-se a partir do diagrama de Pareto que a variável que mais influenciou para a transferência de oxigênio foi agitação, mas aeração também apresentou influência no k_{LA} .

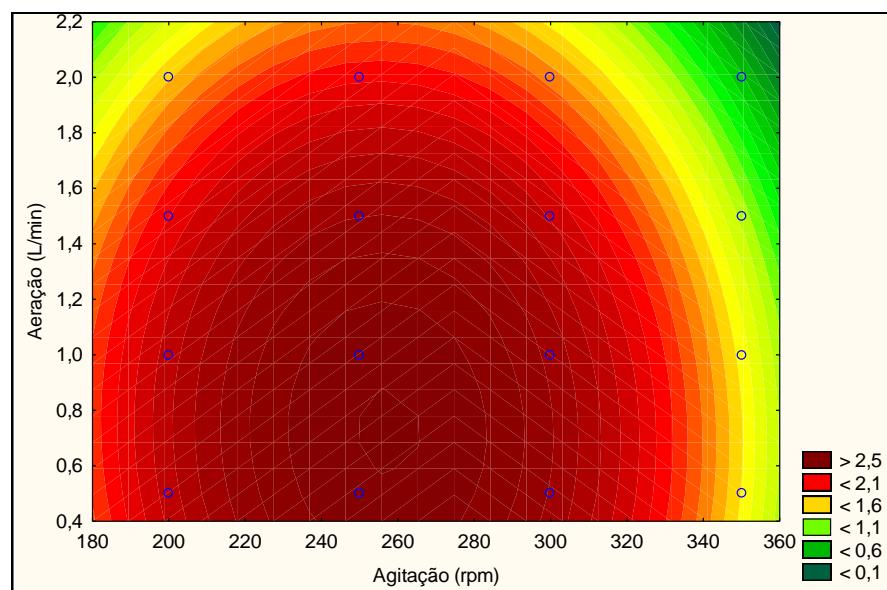
O principal objetivo das condições de aeração e agitação, em biorreator, é a dispersão das bolhas de ar, com consequente suprimento de oxigênio aos micro-organismos, a manutenção das células em suspensão e o aumento da transferência de calor e massa do meio de cultivo. A transferência de oxigênio tem crucial importância no metabolismo de diversos micro-organismos, pois o oxigênio participa da geração de energia através da cadeia de respiração dentro da mitocôndria, que é fundamental para

obtenção de uma velocidade de crescimento específico significante (SILVA *et al.* 2001).

Amani *et al.* (2010) observaram que o k_{La} foi um critério crucial para o scale-up da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, de agitador orbital (*shaker*) para biorreatore de bancada. Fahim *et al.* (2012) reportaram que a transferência de oxigênio é um fator importante para a produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos por cepas de *Bacillus subtilis*, e que agitação e aeração influenciam diretamente neste processo. Posteriormente, Fahim *et al.* (2013) observaram o aumento (175%) da transferência de oxigênio com o aumento da velocidade do líquido e do ar, ao estudar a transferência de oxigênio em reator de fase inversa (leito fluidizado) para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*.

A variação na agitação e aeração do sistema reacional também afetaram o crescimento celular (biomassa) e a formação de produto (biossurfactante). A Figura 27 apresenta a superfície resposta para o comportamento da biomassa como efeito das variações na agitação e aeração do biorreatore de bancada.

Figura 27 – Superfície resposta para a biomassa (g.L^{-1}) em função das taxas de aeração e agitação para o cultivo da cepa ICA56 em biorreatore de bancada.



Observa-se na Figura 27 que elevadas taxas de aeração prejudicam o crescimento celular e que a agitação apresenta um efeito mais significativo do que a

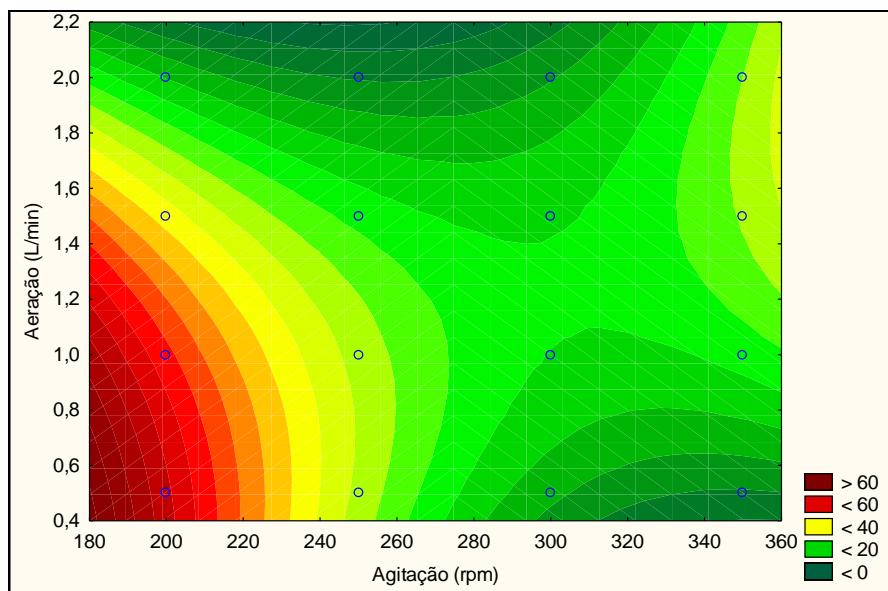
aeração. O maior crescimento celular ocorreu na faixa intermediária de agitação e aeração analisada (em torno de 260 rpm e 1,0 L.min⁻¹).

Schimidell *et al.* (2001) reportaram que a mistura do fluido (sistema reacional) é de crucial importância em bioprocessos, sendo que em cultivos aeróbicos essa é uma operação crítica, pois está diretamente relacionada à transferência de oxigênio para as células. O oxigênio exerce papel fundamental na proliferação da biomassa microbiana e consequentemente na geração de produtos. A taxa com que o oxigênio é consumido pelas células determina a taxa na qual o gás é transferido para o sistema. Normalmente, a demanda específica de oxigênio passa por um período máximo no início da fase exponencial de crescimento microbiano (DORAN, 1995).

Segundo Doran (1995) quando o ar é disperso através do meio líquido, diferentes padrões de fluxo das bolhas de ar podem ocorrer. Se a taxa de agitação é baixa e a de aeração é elevada, o gás envolve o impelidor sem que ocorra dispersão das bolhas, formando um fluxo de ar somente ao longo do eixo da haste do agitador. O aumento da velocidade de agitação faz com que o gás seja capturado sob às pás do impelidor, sendo então disperso através do meio líquido. Já baixas taxas de aeração prejudicam a transferência de oxigênio, e elevadas taxas podem causar turbilhonamento no sistema. O presente estudo observou que o crescimento celular foi mais acentuado em condições moderadas de agitação e aeração.

Neves (2003) afirma que a obtenção de elevadas concentrações de bioproductos de interesse depende diretamente da transferência eficiente de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, pois a concentração celular deve estar elevada. A Figura 28 apresenta a superfície resposta para o comportamento da produção de biossurfactante como efeito das variações na agitação e aeração em biorreator de bancada.

Figura 28 – Superfície resposta para a produção de biosurfactante ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), em função das taxas de aeração e agitação, para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.



Observa-se na Figura 28 que a maior produção de surfactina ocorreu nas condições mais brandas de agitação e aeração (200 rpm e 1,0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). Apesar da maior produção de espumas serem geradas em níveis mais altos de agitação, verificou-se por meio da superfície de resposta (Figura 21) que concentração mais elevada de biosurfactante foi obtida nas taxas de aeração e agitação menores (200 rpm e 1,0 vvm). Isto pode ser atribuído ao fato de que as taxas mais baixas de agitação em sistema, salva a perda súbita de líquido, devido à pressão e o fluxo de ar reduzido, o qual facilita o contato entre o oxigênio e o micro-organismo, causando pouca turbulência ao sistema. Também foi observada a formação de biosurfactante na fase da espuma do sistema estudado, com concentração levemente maior do que a observada no seio do líquido.

Yeh *et al.* (2006) ao cultivarem cepa de *Bacillus subtilis* para produção de biosurfactante, observaram que elevada taxa de agitação e aeração, apesar de produzirem considerável quantidade de espuma, prejudica o crescimento do micro-organismo e a produção de surfactina.

Silva (2013) estudou uma faixa ainda mais abrangente de valores de agitação (180 até valores superiores a 400 rpm) e aeração (0,8 até valores superiores a 2,2 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) e observou o mesmo comportamento que o presente trabalho. Silva (2013) observou que a maior produção de biosurfactante por cepa de *Bacillus subtilis* ocorreu na condição de agitação de 200 rpm e 1 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, apesar de que em condições mais

severas de mistura tenha ocorrido maior formação de espuma. Silva (2013) também relatou que a maior parte do biossurfactante produzido estava na espuma, ao invés do seio do líquido no sistema reacional.

Observou-se que a variação da agitação e aeração no sistema reacional não causou uma variação tão significativa na produção de biossurfactante. A maior produção de surfactina ocorreu na condição de 200 rpm e 1 L.min⁻¹, que foi de aproximadamente 120 mg.L⁻¹ em 24 horas de cultivo, sendo este um resultado pouco satisfatório.

A baixa produção de biossurfactante apresentada pela cepa ICA56 pode ser consideravelmente aumentada se outras configurações do sistema reacional forem utilizadas. Estudos recentes (FAHIM *et al.* 2013; COUTTE *et al.* 2013) apontam que biorreatores com configuração clássica (tanque aerado) não são adequados para a produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos, devido à formação excessiva de espuma durante o processo. Lee *et al.* (2008) mostraram que o uso de agentes antiespuma também não é adequado, pois estas substâncias podem causar algum efeito sobre o micro-organismo, além da possibilidade de interação com o biossurfactante produzido, implicando em um processo mais complexo de purificação.

Segundo Henkel *et al.* (2012), devido a agitação e aeração constante durante o cultivo das cepas produtoras de biossurfactantes, ocorre a excessiva formação de espuma que afetar diretamente os rendimentos de produção. Estudos tem sido realizado visando a aeração e agitação em biorreatores, sem que ocorre formação considerável de espuma (REIS *et al.* 2013; HEYD *et al.* 2008; KRONEMBERGER *et al.* 2008).

Algumas configurações reacionais para produção de biossurfactante do tipo lipopeptídeos são apresentadas como promissoras. Coutté *et al.* (2010) utilizaram reator de membrana aerado sem bolhas e observaram produção de 600 mg.L⁻¹ de biossurfactante do tipo lipopetídeos. Chtioui *et al.* (2012) utilizaram reator de biofilme com disco rotativo para produção de surfactina por cepa de *Bacillus sp.* e relataram produção de aproximadamente 1000 mg.L⁻¹. Fahim *et al.* (2013) utilizaram reator trifásico de fase inversa de leito fluidizado e produziram cerca de 2000 mg.L⁻¹ de surfactina bruta.

4.9 Avaliação de substratos não convencionais para a produção de biosurfactante

Uma alternativa para aumentar a produção de biosurfactantes reside na utilização de substratos não convencionais, tais como resíduos agroindustriais.

Muitos biosurfactantes têm sido produzidos de substratos agroindustriais renováveis e de baixo custo. Uma variedade de subprodutos ou resíduos, que incluem derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas tem sido utilizados na produção de muitos metabólitos microbianos. A utilização de resíduos agroindustriais apresentam algumas vantagens: redução de custos no processo de produção dos biosurfactantes, fontes de elevador teor de carboidratos, lipídeos e nutrientes, em geral, renováveis, além da redução dos possíveis impactos destes resíduos se fossem aplicados ao meio ambiente (SALGADO, 2013; SILVA, 2012; SOBRINHO, 2007).

Tendo em vista estas vantagens, avaliou-se a produção de biosurfactante pelo cultivo da cepa ICA56 em algumas fontes de carbono diferentes: óleo de girassol, soro de leite, suco de caju (clarificado) glicerol e meio mineral (glicose). A Tabela 15 apresenta os resultados de crescimento celular (biomassa) produção de biosurfactante, redução da tensão superficial do meio de cultivo e índice de emulsificação em óleo de motor, para cada substrato analisado.

Tabela 15 – Avaliação de resíduos agroindustriais na produção de biosurfactante pelo cultivo da cepa ICA56 em agitador orbital à 30 °C e 150 rpm durante 48 horas.

Substrato	Biomassa (g.L⁻¹)	Biosurf. bruto (mg.L⁻¹)	Tensão Superficial (mN.m⁻¹)	Redução T.S. (%)	E₂₄ (%)
Glicerol	2,90 ± 0,26	1290 ± 150	28 ± 0,25	53,33 ± 1,20	92 ± 0,26
Óleo de girassol	2,69 ± 0,55	980 ± 100	36 ± 0,00	45,00 ± 4,20	90 ± 0,15
Suco de caju	2,31 ± 0,21	760 ± 120	30 ± 0,30	50,00 ± 2,10	91 ± 0,46
Meio mineral	2,48 ± 0,31	410 ± 160	33 ± 0,00	45,00 ± 1,15	79,6 ± 0,16
Soro de leite	1,67 ± 0,30	370 ± 80	31 ± 0,00	48,33 ± 0,96	70,5 ± 0,59

Observa-se na Tabela 15 que o glicerol e óleo de girassol foram as fontes de carbono que apresentaram maior produção de biosurfactante, apresentando concentrações de aproximadamente 1300 e 1000 mg.L⁻¹. Apesar de baixa produção de

surfactina em alguns substratos, tais como soro de leite (390 mg.L^{-1}) e meio mineral (410 mg.L^{-1}) observa-se que em todos os ensaios ocorreu redução da tensão superficial e formação de emulsão estável em óleo de motor. Os valores de tensão superficial ficaram entre 28 e 36 mN.m^{-1} e os índices de emulsificação foram superiores a 50% . Estes resultados mostram a eficiência do bio surfactante produzido, mesmo em baixas concentrações.

Em glicerol, a tensão superficial do meio, após 48 horas de cultivo, foi de aproximadamente 28 mN.m^{-1} , valor próximo da tensão superficial de uma solução da surfactina padrão comercializada, que é 27 mN.m^{-1} (BARROS *et al.* 2008). Glicerol foi apresentada como a fonte de carbono que gerou maior produção de biomassa. SOUSA *et al.* (2012) propõem que a produção de surfactina esteja diretamente associada ao crescimento celular.

Apesar da notória produção de surfactina em óleo de girassol, observou-se que a tensão superficial não apresentou valor tão reduzido. Este fato pode ser justificado pela presença de óleo residual, não consumido pelo micro-organismo, na amostra que pode ter influenciado na medida de tensão.

Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) estudaram várias fontes de carbono para produção de bio surfactante por *Bacillus subtilis* B5, tendo em vista a otimização da produção e relataram alguns substratos como promissores: melâço de cana-de-açúcar, glicose, maltose, sacarose, sorbitol e glicerol. Estes autores relataram produção de 1100 mg.L^{-1} de surfactina, ao utilizaram melâço como substrato. Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) sugerem que utilizar resíduos industriais na produção de bio surfactantes é um estudo promissor, pois cerca de 30% dos custos da produção estão relacionados ao meio de cultivo.

Zhu *et al.* (2013) avaliaram a produção de bio surfactante por cepa de *Bacillus sp.* em estado sólido e estudaram o efeito de diferentes substratos na produção. Estes autores relataram que a maior produção de surfactina ocorreu com a utilização de glicerol como fonte de carbono, assim como foi observado no presente estudo. Faria *et al.* (2011) estudaram a produção e caracterização estrutural da surfactina produzida pela cepa *Bacillus subtilis* LSFM-05 em glicerol, proveniente da indústria do biodiesel, e relataram produção de 800 mg.L^{-1} de surfactina, valor inferior ao observado no presente estudo.

Vedaramam & Venkatesh (2011) avaliaram a produção de biossurfactante por cepa de *Bacillus subtilis* em óleo de girassol e observaram a produção de surfactina em torno de 250 mg.L^{-1} , em 48 horas de cultivo. Chander *et al.* (2012) estudaram diferentes óleos vegetais como substrato para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* MTCC 441 e relataram que óleo de girassol foi o que mais estimulou o crescimento celular.

Suco de caju clarificado é relatado por Fontes *et al.* (2012) como um substrato promissor na produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. Rocha *et al.* (2008) obtiveram cerca de 280 mg.L^{-1} de surfactina ao cultivar a cepa *Bacillus subtilis* LAMI008 em suco de caju clarificado suplementado de alguns nutrientes, como fonte de nitrogênio e sais minerais. Oliveira *et al.* (2013) estudaram o potencial de produção de biossurfactante por cepa de *Bacillus subtilis* em suco de caju clarificado e relataram produção de aproximadamente 180 mg.L^{-1} de surfactina.

Soro de leite também foi utilizado por Joshi *et al.* (2008) para produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus sp.* Estes autores observaram redução de 40% na tensão superficial durante o cultivo das cepas. Cagri-Mehmetoglu *et al.* (2012) mostraram que a cepa de *Bacillus subtilis* ATCC6633 foi capaz de consumir lactose, presente no soro de leite, e produzir cerca de 200 mg.L^{-1} de surfactina em 72 horas de cultivo. Pereira *et al.* (2013) estudaram diferentes fontes de carbono para a produção de surfactina, por *Bacillus subtilis*, e observaram que, apesar do micro-organismo consumir lactose, esta não é fonte de carbono mais adequada para produção de biossurfactante. Estes autores relataram que a produção foi de aproximadamente 82 mg.L^{-1} , sendo este um valor não tão satisfatório, quando comparado à produção dos outros substratos estudados (citrato de sódio, glicerol, hexano, glicose e extrato de carne).

Makkar *et al.* (2011) discutiram a importância da utilização de resíduos industriais como matéria-prima para bioprocessos. Segundo estes autores, a utilização de resíduos agroindustriais na produção de biossurfactantes pode viabilizar a implantação desses processos em escala industrial. O meio de cultivo pode ser responsável por mais de 30% nos custos do processo de produção de biossurfactante.

Estes resultados mostram que a cepa ICA56 possui potencial biotecnológico na produção de biossurfactante, utilizando substratos de baixo custo. Estes substratos, além de aumentarem consideravelmente a produção, quando comparado ao meio de cultivo sintético (meio mineral) reduzem o custo do processo de produção e ainda

converterem resíduos em produto de elevado valor agregado, e minimizando impactos ambientais.

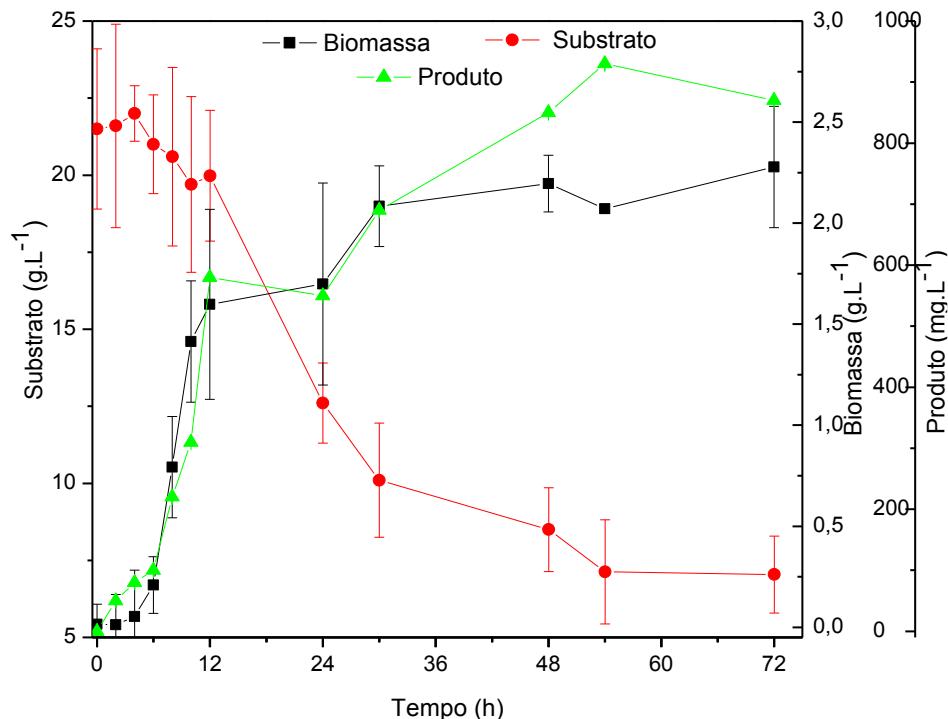
Realizou-se ensaio em agitador orbital (72 horas) para produção de bioassurfactante em óleo de girassol e em glicerol, tendo em vista analisar o comportamento do micro-organismo no que se refere ao crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto de interesse.

4.9.1 Evolução temporal da produção de bioassurfactante em meio de cultivo contendo óleo de girassol como substrato.

A Figura 29 apresenta os resultados de crescimento celular, consumo de substrato, bem como formação de produto, durante o cultivo da cepa ICA56 em meio de cultivo contendo óleo de girassol como fonte de carbono.

Considerável desvio-padrão foi observado nos resultados de substrato, o que pode ser explicado pela imprecisão da metodologia adotada (extração com hexano e posteriormente gravimetria, segundo proposto por Vedaramam & Venkatesh, 2011).

Figura 29 - Produção de bioassurfactante pela cepa ICA56 em agitador orbital, 150 rpm e 30°C em meio de cultivo contendo óleo de girassol: Crescimento celular (■) consumo de substrato(●) e formação de produto (▲).



Observou-se tempo de fase lag relativamente elevado, em torno de 10 a 12 horas de cultivo, o que pode ser justificado pela diferença de composição entre o meio de cultivo e o inóculo. O inóculo, segundo a metodologia adotada, apresenta glicose como fonte de carbono. A glicose é uma fonte de carbono mais fácil de ser assimilada pelo metabolismo de micro-organismo (GADD, 1988). Quando a cepa passou do inóculo, com glicose, para o meio de cultivo, com óleo de girassol, observou-se que ocorreu um tempo de adaptação às novas condições de cultivo.

Nas primeiras horas do ensaio, a baixa taxa de crescimento celular foi acompanhada de pouco consumo de substrato e limitada formação de produto. Após 48 horas de ensaio, houve uma redução ou estabilidade no consumo de substrato, que foi refletido na concentração celular e formação de produto, que também apresentaram concentrações quase constantes.

Chander *et al.* (2012) estudaram diferentes óleos vegetais como substrato para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* MTCC 441 e relataram que óleo de girassol foi o que mais estimulou o crescimento celular, quando comparado a outros óleos vegetais, como óleo de gergelim, coco, mostarda e mamona. Este substrato é apresentado como potencial fonte de carbono para produção de biossurfactante.

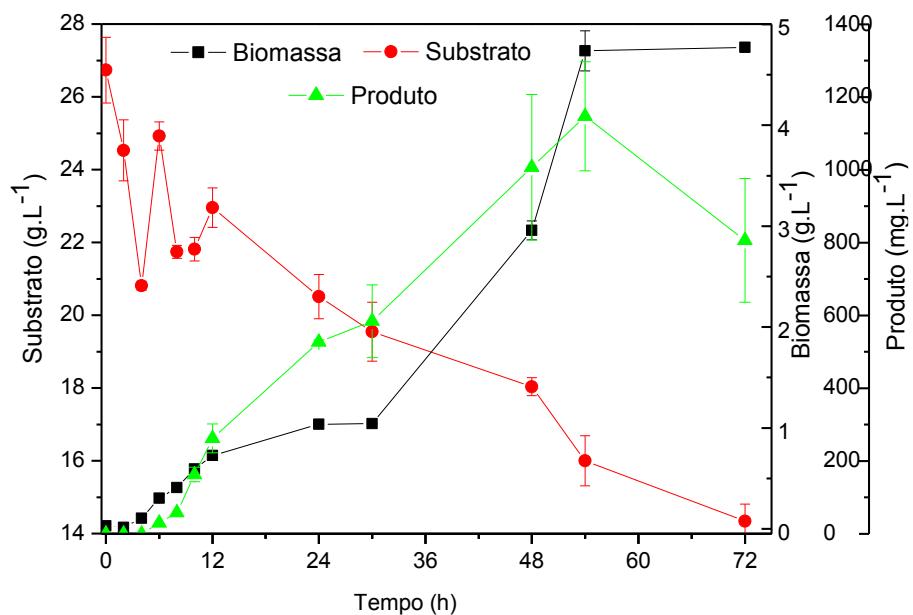
No presente estudo atingiu-se concentração celular de aproximadamente 2,3 g.L⁻¹. A maior produção de biossurfactante (930 mg.L⁻¹) ocorreu em 54 horas de cultivo, apesar de que a partir de 48 horas, a produção fica quase constante. Esta produção de biossurfactante foi capaz de causar redução de 50% na tensão superficial do meio de cultivo.

Vedaramam & Venkatesh (2011) avaliaram a produção de biossurfactante por cepa de *Bacillus subtilis* MTCC2423 em óleo de girassol e observaram biomassa de aproximadamente 3,5 g.L⁻¹ e produção de surfactina em torno de 600 mg.L⁻¹, em 72 horas de cultivo. Apesar de o presente estudo ter obtido crescimento celular inferior, a concentração de surfactina produzida foi em torno de 35% superior aos estudos realizados Vedaramam & Venkatesh (2011). Isso mostra o potencial da cepa estudada em produzir biossurfactante em óleo de girassol.

4.9.2 Evolução temporal da produção de biossurfactante em meio de cultivo contendo glicerol como substrato.

A Figura 30 apresenta os resultados de crescimento celular, consumo de substrato, bem como formação de produto, durante o cultivo da cepa ICA56 em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono.

Figura 30 - Produção de biossurfactante pela cepa ICA56 em agitador orbital, 150 rpm e 30°C em meio de cultivo contendo glicerol: Crescimento celular (■) consumo de substrato (●) e formação de produto (▲).



Observou-se tempo de fase lag de aproximadamente 5 horas, sendo este valor inferior ao observado no cultivo em óleo de girassol (em torno de 11 horas). A mesma composição entre o inóculo e o meio de cultivo pode justificar esta diferença. Souza (2010) obteve o mesmo valor de tempo de fase lag ao cultivar *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio de cultivo contendo glicerol (o mesmo utilizado no presente estudo). Sousa (2012) estudou a produção de biossurfactantes, incluindo o cultivo de cepas de *Bacillus sp.* (lipopeptídeos) em glicerol, e observou que uma mudança na composição do meio foi capaz de reduzir significante, em torno de 80%, o tempo de adaptação do micro-organismo ao meio de cultivo (lag). Barbosa (2011) estudou a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a formulação de biodetergentes utilizando os bioproductos formados.

Diferentemente do presente trabalho, este autor relatou, que ao utilizar glicerol como fonte de carbono, o tempo de fase lag foi de aproximadamente 30 e 50 horas, respectivamente, mostrando que para estes micro-organismos, a utilização de glicerol não é viável, pois grande desperdício de tempo de produção para escala industrial. O curto tempo de fase lag observado no cultivo da cepa ICA56 apresenta indícios da viabilidade da bioconversão de glicerol em biossurfactante.

A maior concentração celular ocorreu em 54 horas de cultivo, correspondendo a aproximadamente 4 g.L^{-1} , e este valor permaneceu praticamente constante em 72 horas. Esta elevada biomassa mostra a aceitabilidade do metabolismo do micro-organismo em consumir o glicerol e promover o crescimento celular, convertê-lo em metabólitos, além da manutenção celular (SCHIMIDELL *et al.* 2001). Reis *et al.* (2004) obtiveram biomassa cerca de $1,3 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas de incubação, ao cultivar *Bacillus subtilis* ATCC663 em meio de cultivo contendo glicerol. Entretanto outros estudos mais recentes, como Sousa (2010); Faria *et al.* (2011) e Sousa (2012) mostram que cepas de *Bacillus sp.* podem crescer e atingir concentrações elevadas de biomassa em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono, assim como foi observado no presente trabalho.

Observa-se na Figura 30 que nem todo o substrato foi consumido durante o cultivo. Aproximadamente 50% do glicerol disponível foi convertido em biomassa e metabólitos pela cepa ICA56 (além da manutenção celular). SCHIMIDELL *et al.* 2001 afirma que nem o substrato se esgota completamente quando a concentração celular é máxima, podendo ainda haver uma concentração residual desta substância, ao término do cultivo. Este comportamento também foi observado em outros estudos: Ciapina *et al.* (2007); Faria *et al.* (2011); Sousa (2011); Barbosa (2011); Sousa (2012) e Zhu *et al.* (2013).

A maior produção de biossurfactante ocorreu em 54 horas de cultivo, correspondendo a aproximadamente 1150 mg.L^{-1} . A produção de surfactina foi responsável pela redução na tensão superficial da água de 72 para 28 mN^{-1} , equivalente a uma redução de 62%, mostrando a eficiência deste bioproduto como tensoativo. A partir de 48 horas de incubação da cepa ICA56, a produção de surfactina permaneceu aproximadamente constante. Entretanto a partir de 24 horas de ensaio, a tensão superficial do meio de cultivo livre de células atingiu valores próximos a 30 m.Nm^{-1} e permaneceu praticamente permanente até o final do cultivo (72 horas de

incubação). Segundo Gudina *et al.* (2010) um eficiente tensoativo é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para valores inferiores a 35 mN.m^{-1} .

Sousa *et al.* (2012) realizaram um screening dentre algumas bactérias isoladas de Tanque de Tramento de Esgoto, e identificaram 2 cepas de *Bacillus sp.* como potenciais produtoras de biosurfactante. Estes autores relataram produção de 270 mg.L^{-1} e 440 mg.L^{-1} , para os cultivos de *Bacillus subtilis* LAMI009 e LAMI005, respectivamente, ao utilizar o mesmo meio de cultivo, contendo glicerol, que o presente trabalho.

Sousa (2012) realizou ensaios cinéticos variando condições de cultivo, tendo em vista a otimização da produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis*, e observou que ao utilizar meio de cultivo com glicerol e 2% de inóculo obteve produção de aproximadamente 150 mg.L^{-1} de surfactina. Faria *et al.* (2011) estudaram a produção surfactina produzida pela cepa *Bacillus subtilis* em glicerol em biorreatore de bancada de 10 L e relataram que grande parte do biosurfactante produzido está presente na fase da espuma, e que a maior concentração de surfactina ocorreu em 72 horas de cultivo, que foi de 1320 mg.L^{-1} . Zhu *et al.* (2013) avaliaram a produção de biosurfactante por cepa de *Bacillus sp.* em estado sólido, como glicerol como fonte de carbono, e obtiveram produção de aproximadamente 1200 g.L^{-1} de surfactina. Estes resultados mostram que a produção de biosurfactante em meio de cultivo contendo glicerol foi satisfatória, pois a concentração obtida foi superior ou similar a alguns resultados relatados por outros autores.

Consideráveis volumes gerados de glicerol são gerados da indústria do biodiesel, podendo até ser apresentado como um risco ambiental. A utilização do glicerol como fonte de carbono para a produção de biosurfactantes é um estudo promissor, pois se trata de um substrato de baixo custo e que pode ser assimilado pelo metabolismo de diferentes micro-organismos produtores de biosurfactantes, como relatado por alguns autores: Ciapina *et al.* (2007); Faria *et al.* (2011); Sousa (2011); Barbosa (2011); e Zhu *et al.* (2013).

5 CONCLUSÕES

O bioassurfactante produzido pela cepa ICA56, em meio mineral, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30mN.m^{-1} e interfacial de um sistema água/gasolina de 15 para 3 mN.m^{-1} , mostrando sua eficiência como tensoativo.

Este bioproduto foi capaz de produzir emulsão estável em algumas fontes hidrofóbicas, tais como óleo de motor, óleo de soja, hexano e querosene, apresentando índices de mulsificação superiores a 60% e estabilidade do sistema emulsionado por mais de 24 horas. As propriedades emulsificante e tensoativas do bioproduto formado no cultivo da cepa ICA56 mostraram-se estáveis e eficientes frente às variações de pH, temperatura e concentração salina. Outro resultado que comprova a eficiência do bioassurfactante produzido é a sua concentração micelar crítica em torno de 25 mg.L^{-1} , sendo este valor inferior ao dos surfactantes químicos e de outros bioassurfactantes. O bioassurfactante produzido foi capaz de remover hidrocarbonetos e metais pesados em sistemas que simulavam ambientes contaminados, apresentando eficiência, quando comparado aos surfactantes químicos.

Apesar da eficiência das propriedades funcionais e aplicabilidade do bioassurfactante, a produção em meio mineral contendo glicose foi em torno de 200 mg.L^{-1} , sendo esta uma concentração razoável. A variação da agitação e aeração em biorreator de bancada não apresentou um resultado tão em termos de produção de bioassurfactante. Já a utilização de substratos não convencionais mostrou-se como uma melhor alternativa para aumentar a produção de bioassurfactante, pois, além da possibilidade de reduzir custos no processo, foram observados maiores rendimentos do que no meio sintético (glicose). Óleo de girassol e glicerol foram apresentados como potenciais fontes de carbono para produção de bioassurfactante pela cepa ICA56, obtendo concentrações de 980 mg.L^{-1} e 1290 mg.L^{-1} do produto de interesse, respectivamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFA, M. M. & HASSOUNA, N. A. H. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, , p. 289-303, 2008.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFA, M. M. & HASSOUNA, N. A. H. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 289-303, 2008.
- AL-BAHRY, N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE , A. E. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery, **International Biodeterioration Biodegradation**, vol.81, p.141–146, 2013.
- AL-WAHAIBI ,Y.; SANKET, J.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL B., Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2013.
- AMANI, H.; MERHNIA, M. R.; SARRAFZADEH, M. H.; HAGHIGHI, M.; SOUDI, M. R. Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 162, p. 510–523, 2010.
- ANTUNES, M. S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas utilizadas em misturas 3 em 1. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.22, p. 45-53, 2007.
- APARNA, A; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B, **Colloids and Surfaces B**, vol. 95, p. 23–29, 2012.
- BANAT, I; FRANZETTI, A; GANDOLFI, I; BESTETTI, G; MARTINOTTI, M, FRACCHIA, L. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87(2), p. 427-44, 2010.
- BARBOSA, S. A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biosurfactantes como matéria-prima**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Rede Nordeste de Biotecnologia, São Cristóvão – SE, 2011.

BARRETO, R. V. G., **Prospecção de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solos de manguezais**, 2011. Tese (Doutorado em Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) Universidade Federal do Ceará, 2011.

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

BARROS, L. M. **Biosorção de metais pesados presentes em águas de produção da indústria de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – Rio Grande do Norte, 2001.

BEZERRA, M. S., **Estudo da produção de biosurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono**, 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

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

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H., Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, P. 1-6, 2010.

BUGAY, C. **Biosurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização**. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, 2009.

CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal Dairy Science**, v. 95 (7) p. 3643-3649, 2012.

CAMEOTRA, S. S, & MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure Appl. Chem.**, v. 82(1), p. 97-116, 2010.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J. A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P. P.; BUGAY, C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state

cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. **Biotechnology Journal**, vol. 4: p. 748–755, 2009.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 2, 2009 .

CHANDER, C. R. S; T. LOHITNATH; KUMAR, D. J. M; KALAICHELVAN, P. T. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio-preservative. **Advances in Applied Science Research**, v. 3 (3) p. 1827-1831, 2012.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. “Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation”. **Journal Appl. Microbiol**, v. 93, p. 915–929, 2002.

CHTOUI, O.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; DHULSTER, P.; NIKOV, I. Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production, **Process Biochemistry**, v. 48, p. 2020-2024 2012.

CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTANNA, L. M. M.; SANTOS, A. S.; FREIRE D. M. G.; PEREIRA, N. J. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 131, p. 880-886, 2007.

CORREIA, J. A. C.; MARQUES, J. E.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters, **Bioresource Technology**, v. 139, p. 249-256, 2013.

COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils. **Proc. Biochem.**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; YAHIA, S. A.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, P. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, 2010, p. 499-507, 2010.

COUTTE, F; LECOUTURIER, D.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, HULSTER, P.; New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and

purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor,
Process Biochemistry, v. 48, p. 25-32, 2013

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C.
 Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 179, p.
 32-37, 2002.

CRUZ, J. F. **Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar**. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do Petróleo e Ambiental) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador – Bahia, 2012.

DAHRAZMA, B.; MULLIGAN, C.N. Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration, **Chemosphere**, vol. 69, p. 705-711, 2007.

DALEMOUNT, E. **O Petróleo**. 2.ed. SÃO PAULO. Difusão Européia do Livro, 1961.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 4887–4890, 2009.

DEHGHAN-NOUDEH G.; HOUSAINDOKHT M.; BAZZAZ B. S. F. Isolation, Characterization, and Investigation of Surface and Hemolytic Activities of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Journal of Microbiology**, v. 43 (3) p. 272-276, 2005.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiol. Mol. Biol. Journal.**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DORAN, P.M., **Bioprocess Engineering Principles**, Academic Press London, 1995.

DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotech. Advan.** v. 9, p. 241-252. 1991.

- FAHIM, S.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; VAUCHEL, P.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21, **Bioresource Technology**, v. 126, p.1-6, 2012.
- FAHIM, S.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; VAUCHEL, P.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 70–76, 2013.
- FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; BARBOSA, G. N. O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TÓTOLA, M. R.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1951-1957, 2011.
- FELIX, A. K. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir de suco de caju**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC) Fortaleza – Ceará, 2012.
- FENDLER, J. H. & TUNDO, P. Polymerized surfactant aggregates: characterization and utilization. **Accounts Chem. Res.** v. 17, p. 3-8, 1984.
- FERRÃO, C. M. **Derramamentos de óleo no mar por navios petroleiros**. Monografia (Especialização Executiva em Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2005.
- FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **TIBTECH.**, v. 10, p.208 – 217, 1992.
- FONTES, G. C.; RAMOS, N. M.; AMARAL, P. F. F.; NELE, M. ; COELHO, M. A. Z. Renewable resources for biosurfactant production by *yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** (Impresso) v. 29, p. 483-494, 2012.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrate. **Bioresour. Technol.**, 75, p. 235-240, 2000.

FRANÇA, I. W. L., **Estudo da produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 visando biorremediação in situ**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

FREITAS, M. F. M., **Produção de β-galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana**, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

GADD, G. M. Carbon nutrition and metabolism. In: Berry, D. R. **Physiology of Industrial Fungi**. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 21-57, 1998.

GENTRY, T.; RENSING, C.; PEPPER, I. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 34(5), 447-94, 2004.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnol. J.**, v. 4, p. 738–747, 2009.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor, **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 738–747, 2009.

GNANAMANI, A.; KAVITHA, V.; RADHAKRISHNAN, N.; RAJAKUMAR, G.S.; SEKARAN, G.; MANDAL, A.B. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 79, p. 334 –339, 2010.

GUDINA, E. J.; TEIXEIRA J, A.; RODRIGUES L. R.; Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*, **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 76 (1) p. 298-304, 2010.

HATHOUT, Y.; RYZHOV, V.; DEMIREV, P.; FENSELAU, C. Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1492-1496, 2000.

HENKEL, M; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47(8) p. 1207-1219, 2012.

HESTER, A. IB Market forecast. **Indust. Bioprocess**, v. 23, p. 3, 2001.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHÄFER, F.; BRENNER-WEISS, G. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391(5), p. 1579-1590, 2008.

HWANG Y.; KIM M.; SONG I.; PARK B.; LIM J.; PARK S.; YUN H. Subacute (28 day) Toxicity of Surfactin C, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, in Rats. **Journal of Health Science**, v. 55 (3) p. 351-355, 2009.

JAIN, R. M.; MODY, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth, **Carbohydrate JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; A. J. DESAI. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions, Bioresource Technology**, vol. 99, p. 195–199, 2008.

JUWARKAR, A. A.; DUBEY, K. V.; NAIR, A.; SINGH, S. K. Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant—a novel approach. **Indian Journal of Microbiol**, v. 48, p. 142–146, 2008.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, p. 311-318, 2012.

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. **Journ. of Ferment. and Bioengin.**, v. 84, n. 1, p. p. 41-46, 1997.

- KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M., Electron Cryo-Microscopic Studies on Micellar Shape and Size of Surfactin, an Anionic Lipopeptide. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 5 (1-2) p. 43-48, 1995.
- KOSARIC, N., Biosurfactants in Industry. **Pure. Appl. Chem.**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.
- KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: SEN, R. (Org) **Biosurfactants**. Georgetown: Lands Bioscience, 2009.
- KRONEMBERGER, F. D. A.; SANTA'ANNA, L. M. M.; FERNANDES, A. C. L. B.; MENEZES, R. R. D.; BORGES, C. P.; FREIRE, D. M. G. Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 147, p. 37-45, 2008.
- LAI, C. C.; HUANG, Y. C.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazard. Materials**, v. 167, p. 609–614, 2009.
- LEE, B. S.; KIM, E. K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639-647, 2008.
- LEE, S.; Y, LEE, D. Y.; & KIM, T. Y. Systems biotechnology for strain improvement. **Trends Biotechnol.**, v. 23(7), p. 349-358, 2005.
- LI, M. Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. **Chemosphere**, v. 70 (10) p. 1793-1806, 2008.
- LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 1996.
- LIMA, L. B., **Frequência de bactérias produtoras de biosurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará**, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências

Marinhas Tropicais) – Intituto Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Isolation and characterization of a C-12 lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO121. **Journal of Peptide Science**, v. 14, ed. 7, p. 864-875, 2008.

LIWARSKA-BIZUKOJC, E.; MIKSCH, K.; MALACHOWSKA-JUTSZ, A.; KALKA, J. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. **Chemosphere**, v. 58, p. 1249–1253, 2005.

LUNA, J. M. ; RUFINO, R. D. ; SARUBBO, L. A. ; CAMPOS-TAKAKI, G. M. . Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-116, 2003;

MAITY, J. P.; HUANG, Y. M.; HSU, C.; WU, C.; CHEN, C.; LI, C.; JEAN, J.; CHANG, Y.; CHEN, C. Removal of Cu, Pb and Zn by foam fractionation and a soil washing process from contaminated industrial soils using soapberry-derived saponin: A comparative effectiveness assessment, **Chemosphere**, v. 92, p. 1286-1293, 2013

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, p. 5-24, 2011.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Jounal of Plants Medicinal**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILLIOLI, V. S.; SERVULO, E. L. C.; SOBRAL, L. G. S.; CARVALHO, D. D. Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of Rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency, **Global NEST Journal**, v. 11 (2) 181-188, 2009.

MOHAMED, A. O.; GAMAL, M.; ZEKRI, A. Y. Effect of salinity and temperature on water cut determination in oil reservoirs, **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 40, .p 177-188, 2003.

MORÁN, A. C.; MARTÍNEZ, A. M.; SIÑERIZ, F. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 177–180, 2000.

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

MÜLLER, M. M, KÜGLER, J. H, HENKEL, M, GERLITZKI, M, HÖRMANN, B, PÖHNLEIN, M. Rhamnolipids-Next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, v. 62(4), p. 366-380, 2012.

MULLIGAN, C. N. Enviromental aplications for biosurfactants. **Environm. Pollution**, v. 133 p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, C. N.; B. F. GIBBS, B. F. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin, **Environmental Science and Technology**, vol. 33, pp. 3812–3820, 1999.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Eng. Geol.**, v. 60, p. 371, 2001.

MUTHUSAMY K.; GOPALAKRISHNAN S.; RAVI T.K.; SIVACHIDAMBARAM P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-746, 2008.

NAJAFI, A.R.; RAHIMPOUR, M.R.; JAHANMIRI, A.H.; ROODTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; GHOBADI, Z. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal.** 163, p. 188-194, 2010.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization, **Bioresource Technology**, v. 147, p. 619-622, 2013.

NEVES, L. C. M. **Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de *S.cerevisiae* W303-181.** Ribeirão Preto, 2003, 284 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto – SP, 2003.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microrganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz. Jour. of Microb.**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bior. Tech.**, v. 97, p. 336-341, 2006.

NOORDMAN, W. H.; JANSSEN, D. B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68(9), p. 4502-4508, 2002

OLIVEIRA, D. W. F., **Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANCA, I. W. L.; FELIX, A. K.; MARTINS, J. J.; GIRO, M. E.; MELO, V. M.; GONCALVES, L. R. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 101, p. 34-43, 2013.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J. L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, ed. 4, p. 1084-1090, 2007.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 633-654, 2011.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R.; Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications, **Fuel**, v. 111, p. 259-268, 2013.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro – São Paulo, 2006.

PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative study for Biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**, v. 2(4) p. 284-287, 2009.

QAZI, M. A.; SUBHAN, M.; FATIMA, N.; ALI, M. I.; AHMED, S. Role of Biosurfactant Produced By Fusarium sp. BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column, **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, p. 598-604, 2013.

RAMKRISHNA, S. **Biosurfactants**. Springer Science & Business Media, 2010.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; DE FRANÇA, F. P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* grown on Low-Cost raw materials. **Appl. Bioch. and Biotech.**, v. 113-116, p. 899-912, 2004.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications, **Biodegradation - Life of Science**, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, 2013, v. 01, p. 1-370, 2013.

ROCHA, M. V. P. **Produção de biosurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC) Fortaleza – Ceará, 2007.

ROCHA, M. V. P., GOMES-BARRETO, R. V., MELO, V. M. M., GONÇALVES, L. R. B., Evaluation of Cashew Apple Juice for Surfactin Production by *Bacillus subtilis* LAMI008. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 155 (1-3) p. 366-378, 2008.

ROCHA, M. V. R.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural Cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **Wor. J. Microb. and Biotech.**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Biosurfactants production from cheese whey. **Advances in Cheese Whey Utilization**, v. 2008, p. 81-104, 2008.

ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J. L.; DÁVILA, J. C.; PÉREZ-GARCÍA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 969-976, 2007.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants, **Environment Microbiology**. v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSEN, M. J. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 3º Edição. New York: Wiley-Interscience, p. 244, 2004.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; MARINHO, P.H.C.; FARIAS, C. B. B.; FERREIRA, S. R. M. ; SARUBBO, L. A. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v. 109, p. 117-122, 2013.

SAKATO, N. **Fermentation and biochemical engineering handbook – principles, process design, and equipment**. 2º Edição. Noyes publications, USA, cap 1, p.2, 1997.

SALGADO, J. R. **Produção de biosurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Departamento de

Engenharia Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Estadual do Paraíba, Campina Grande, 2013.

SANTA'ANNA, L. M., SEBASTIAN, G.V., MENEZES, E.P., ALVES,T. L. M., SANTOS, A. S. PEREIRA JR, N. e FREIRE, D. M. G., Production of Biosurfactants from Pseudomonas aeruginosa PA1 Isolated in Oil Environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19 (2) p. 159–166. (2002).

SANTANA, D. C. **Extração de metais pesados de efluentes da indústria do petróleo utilizando derivados de óleos vegetais como extratantes**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – Rio Grande do Norte, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, ed.1, v. 2, p. 539, 2001.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 141-148, 2004.

SHAW, D. J. **Introduction to colloids and surface chemistry**. Editora Edgar Blucher Ltda, p. 181, 1970.

SHETE, A. M; WADHAWA, G, BANAT; I. M; CHOPADE, B. A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 65, p. 91-115, 2006.

SILVA, D. P.; PESSOA, A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 91, p. 605-613, 2001.

SILVA, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, M. T. S. **Produção e concentração integrada de surfactina a partir de bacillus sp ITP-001 em fracionamento com espuma em semi-batelada.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.

SILVA, R. S.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; L. FILHO, H. J. B.; SANTOS, V. A. ; Sarubbo, Leonie Asfora . Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v. 50, p. 137-142, 2013.

SINGH, A. K.; CAMEOTRA, S. S. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 20, p. 7367-7376, 2013.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Applications aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; J. M MITCHELL, D . A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent, **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1848-1855, 2012.

SOBRINHO, H. B. S. **Resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de bio surfactantes por Candida sphaerica.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SOUSA, J. R., **Produção de lipopeptídeos e glicoliídeos partir da bioconversão do co-produto da produção do biodiesel**, 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SOUSA, M., **Bioconversão de glicerol para produção de bio surfactantes: aplicações no preparo de emulsões**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SOUZA, M.; MELO V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H.B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant - producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 897-902, 2012.

SOUZA SOBRINHO, H. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO, L. A. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-12, 2013.

SOUZA, H. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO, L. A. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-12, 2013.

SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K; VENKATARAMAN, D.; GRACEROSEPAT, R.; SRISAKTHI, K.; GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 174-181, 2011.

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

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, p. 249-256, 1996.

VARADAVENKATESAN, T.; MURTY, V. R. Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus sp.* and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery, **Microbiology**, vol. 2013, 8 pages, 2013.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1

isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

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

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 175-180, 2011.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 175-180, 2011.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WINTERBURN, J.B.; MARTIN, P.J.; RUSSELL, A.B. Recirculating biosurfactant foam stripper for integration with industrial fermenters. Special Abstracts. **Journal of Biotechnology**. v. 150S, p. S1-S576, 2010.

YEH, M. S.; WEI, Y. H. CHANG, J.S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1799-1805, 2006.

ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. **Journal Environ. Manage**, v. 127, p. 96-102, 2013.

ANEXO

Tabela A.1 - Tabela de análise de variância

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	P-valor
Regressão	1104,289	5	220,85	31,55	10%
Residual	79,69	10	7,969		
Total	1183,979	15			
F _{tab} (90%)				2,52	

Figura A.1 - Diagrama de Pareto mostrando a contribuição da agitação e aeração na transferência de oxigênio (k_{La}) durante o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

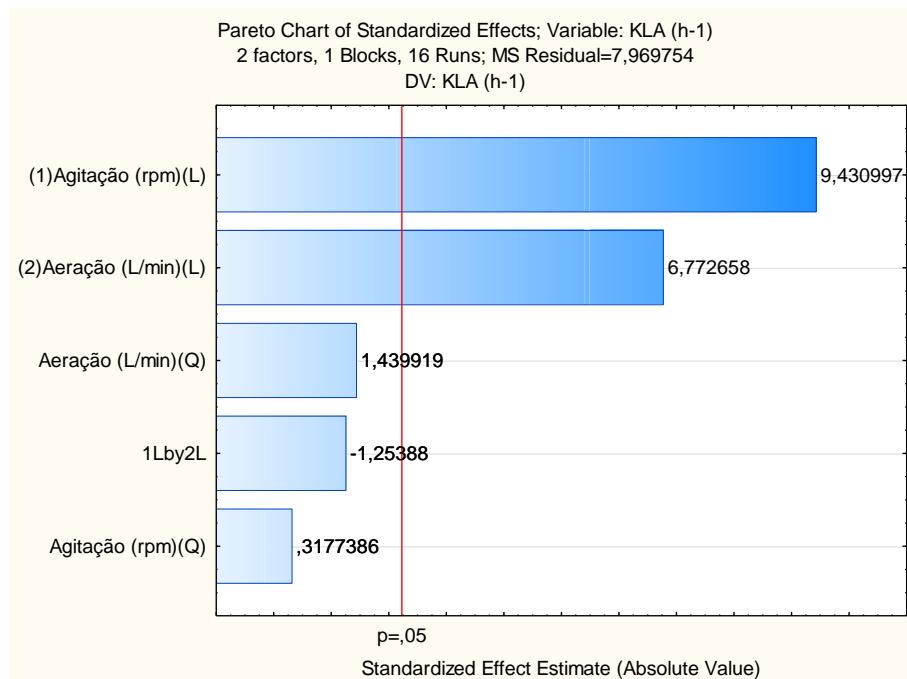


Figura A.2 – Superfície resposta para o k_{La} (h^{-1}) em função das taxas de aeração e agitação para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

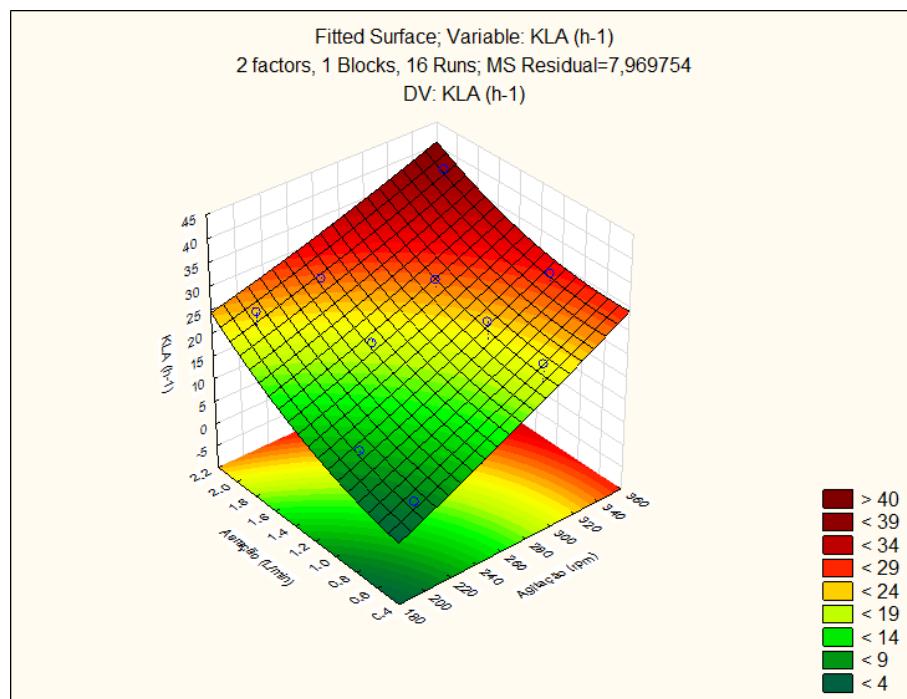


Figura A.3 - Diagrama de Pareto mostrando a contribuição da agitação e aeração no crescimento celular (biomassa) da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

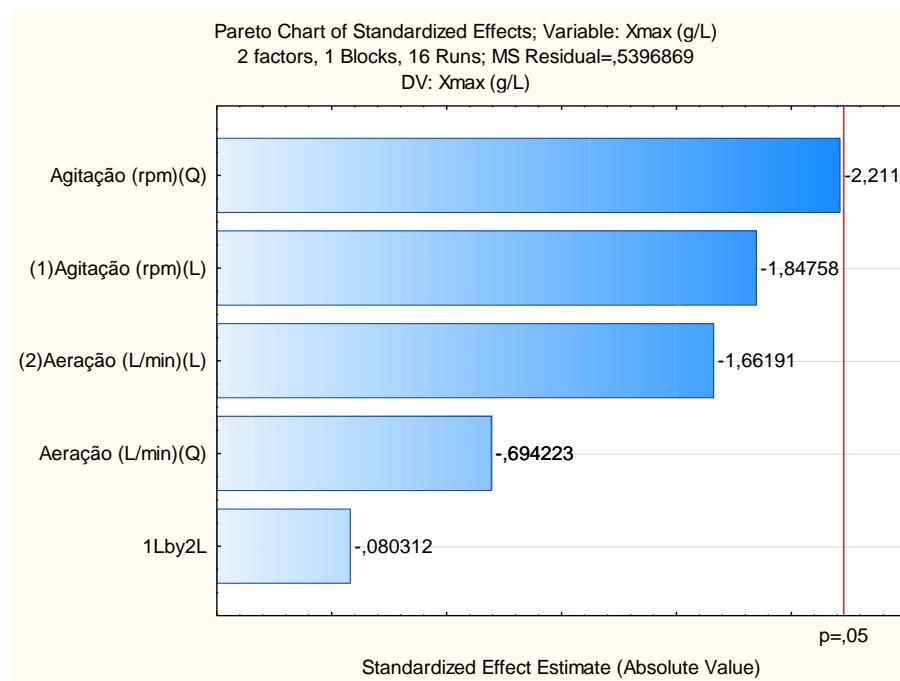


Figura A.4 – Superfície resposta para a biomassa (g.L^{-1}) em função das taxas de aeração e agitação para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

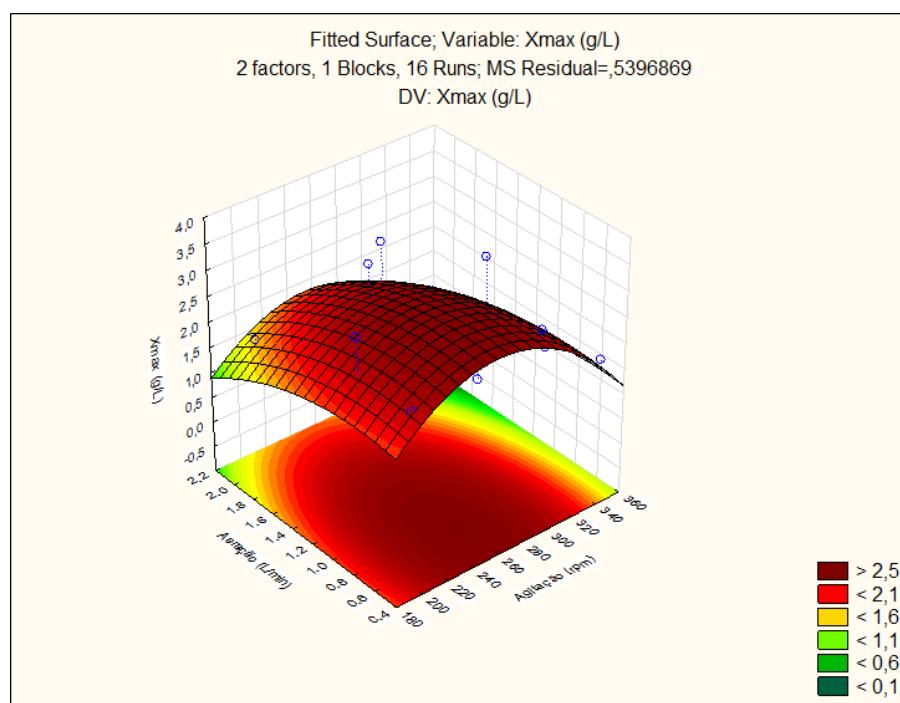


Figura A.5 - Diagrama de Pareto mostrando a contribuição da agitação e aeração na produção de biossurfactante durante o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

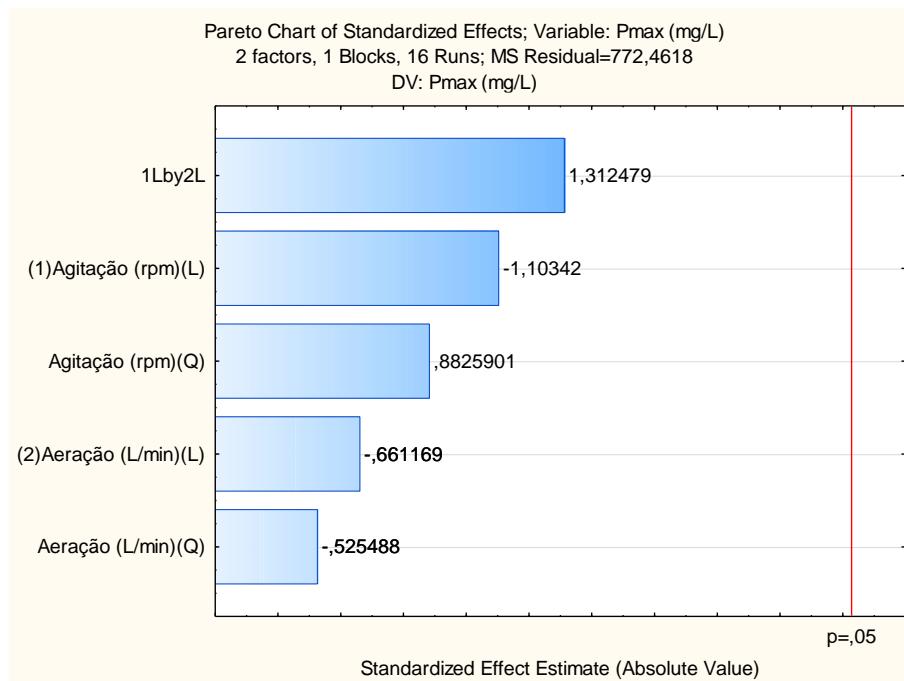


Figura A.6 – Superfície resposta para a produção de biossurfactante ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em função das taxas de aeração e agitação para o cultivo da cepa ICA56 em biorreator de bancada.

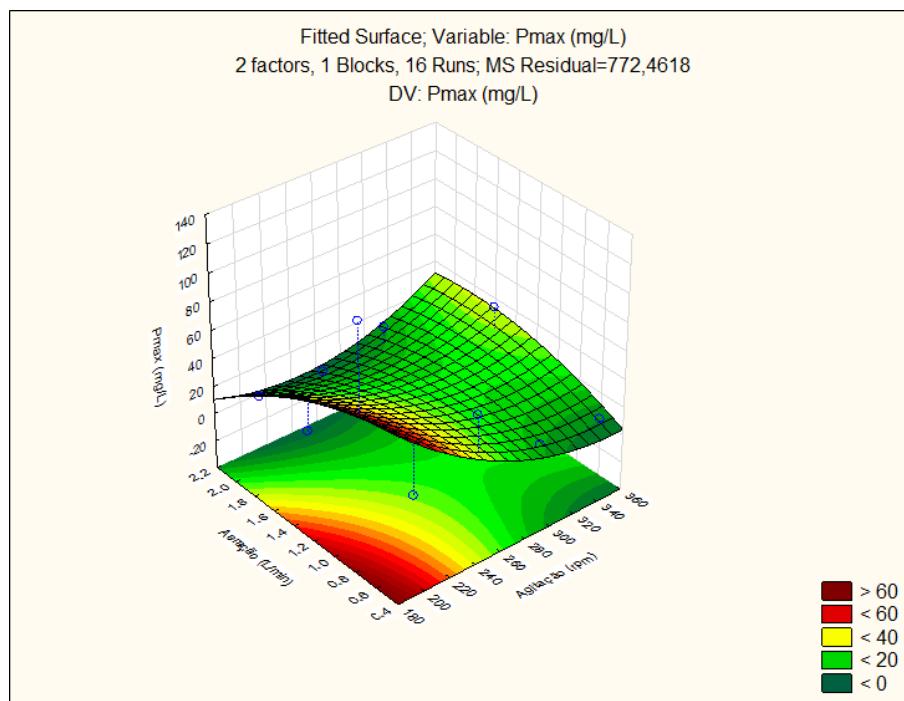


Tabela A.2 – Modelo de ajuste das variáveis-resposta (X = agitação em rpm; Y = aeração em $L\cdot min^{-1}$).

Variável	Modelo de ajuste
$K_{La} (h^{-1})$	$Z = -19,4864 + 0,105131 \cdot X + 0,0000897 \cdot X^2 + 6,175 \cdot Y + 4,065 \cdot Y^2 - 0,0283184 \cdot X \cdot Y$
$X_{máx} (g \cdot L^{-1})$	$Z = -8,1812 + 0,083 \cdot X - 0,0001625 \cdot X^2 + 0,858 \cdot Y - 0,509 \cdot Y^2 - 0,000472 \cdot X \cdot Y$
$P_{máx} (mg \cdot L^{-1})$	$Z = 333,47075 - 1,85108 \cdot X + 0,002453 \cdot X^2 - 51,9571 \cdot Y - 14,605 \cdot Y^2 + 0,29182 \cdot X \cdot Y$