



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**BRENDA NOVAIS SANTOS**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE**

**FORTALEZA  
2019**

BRENDA NOVAIS SANTOS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Química do Departamento de Engenharia  
Química da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha  
Barros Gonçalves.

Coorientadora: Profa. Dra. Sueli  
Rodrigues.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S233o Santos, Brenda Novais.

Otimização da produção de biossurfactante / Brenda Novais Santos. – 2019.

62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

1. Aureobasidium pullulans. 2. Bacillus subtilis. 3. Reator de agitação mecânica. 4. Reator airlift. 5. Surfactina. I. Título.

---

CDD 660

BRENDA NOVAIS SANTOS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Química do Departamento de Engenharia  
Química da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Rilvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Maria Cristiane Rabelo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por ser sempre meu guia;  
À minha família, pela oportunidade de  
estudar e chegar até aqui;  
À minha irmã, por me manter firme e não  
me deixar desistir.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre guiar minhas decisões, não me permitir desanimar com um fracasso momentâneo. Sem Ele tudo seria nada.

À minha família, pela força, me apoiado nessa trajetória e por terem acreditado em mim, até quando eu mesma não acreditava.

À minha irmã, Bia, por, mesmo sem entender, esteve ao meu lado e todos os dias dizia que tudo daria certo, até naqueles dias em tudo parecia dar errado, por não me permitir desistir de tudo, por ser minha amiga, companheira, parceira, meu ombro amigo, meu tudo.

À minha avó Dolores, por todo amor, cuidado e pelo exemplo de mulher que ela é.

À Leuda, por ter cuidado de mim durante todos esses anos, em todos os momentos.

Aos meus tios, sempre presentes, me apoiando em tudo.

À professora Luciana Gonçalves, por toda a confiança, pela oportunidade, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela direção, pelas correções e orientação. Tem todo meu respeito, carinho, minha admiração e minha gratidão.

À professora Sueli Rodrigues, por ter aberto as portas do Labiotec para mim, por acreditar no meu trabalho, pelas oportunidades, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade, por todo apoio dentro e fora do laboratório. Tem todo meu respeito, minha admiração e minha gratidão.

À professora Valderez Ponte, pela disponibilidade, por ajudar sempre e pelos conselhos.

Ao professor André Casimiro, por dividir seu conhecimento, pela a ajuda quando os problemas pareciam não ter solução e por estar sempre presente.

Aos colegas do GPBio, por estarem presentes nos cafés e na luta do dia a dia desses anos, por fazerem os dias de luta mais leves.

Aos colegas do Labiotec por terem me recebido com tanto amor, carinho, por ajudarem sempre em tudo, por serem tão amigos e parceiros, pelos momentos de descontração, pelos almoços, cafés e lanches. Só gratidão e amor.

Ao Ítalo, primeira pessoa com quem trabalhei, super paciente, ensinou muito, aflorou meu amor por reatores, mostrou que nem sempre as coisas dão certo, mas com os amigos junto, tudo se resolve.

Ao Tiago, por todas as risadas no meio de um dia cheio, pelas conversas, pela parceria e companheirismo.

Ao Luiz, por sempre ajudar, mesmo quando estava ocupado, por ser um amigo e companheiro, pela preocupação, pelos lanches, por chegar mais cedo, mesmo sem precisar, só para nos ajudar.

À Cris Rabelo, por ter sido tão generosa em compartilhar comigo seus conhecimentos, por se tornar uma grande amiga e uma das minhas mães, por todos os dias, inclusive nossos sábados, domingos e feriados que passamos trabalhando, por todas as vezes em que, mesmo já em outro laboratório, saía do expediente para me fazer companhia a noite, para que eu não ficasse só, pelos nossos cafés da manhã, lanches, almoços, jantas, por tudo que fez e por tudo o que é.

À Jouci, minha bebezinha, por sempre estar perto, presente, por ser luz na minha vida, por dividir comigo dias bons e os não tão bons, por compartilhar momentos, passeios, viagens, pela companhia nos almoços, por ajudar quando eu precisei, por me acompanhar no shopping, em festas, nos aniversários, casamentos, praia, mas também nos hospitais (somos mestres nessa arte), por todos os abraços, todas as palavras, conselhos, por saber quando eu não queria falar, só precisava de colo, enfim, por tudo o que representa para mim.

À Valdelice, pelos momentos que dividimos, pelas risadas, pelos lanches, pela companhia, pela confiança, pelo amor e amizade de sempre.

À Ana Cristina, nos aproximamos em um momento muito difícil meu, e ela sempre presente, preocupada, cuidando e ajudando e pela amizade.

Ao Arthur, um grande presente que o DEQ me deu, chegou de repente e logo conquistou seu lugar no meu coração, um amigão, parceiro e cupido, longas conversas, brincadeiras e apelidos carinhosos.

Aos amigos feitos durante o curso: Amanda Maria, Amando, André, Bárbara, Camis, De Assis, Laís, Mairlane e Yá, por tudo o que passamos juntos, por todos os trabalhos, finais de semana sofridos, mas também nossas horas felizes, cinemas, festas, rodízios, drinks, por tudo o que vivemos.

À Dayane, a irmã que Deus me deu, é mais do que se fosse de sangue, é de coração, sempre presente, mesmo que fisicamente estivesse longe, por todos os momentos de paz compartilhados, por todas as dificuldades divididas, pela amizade, companheirismo, confidencias, por tudo, por tanto sempre.

“Lá onde mora o amor  
não há dor, não há tristeza,  
lá tem cor, lá tem riqueza,  
lá tem bem, lá tem nobreza.  
Lá onde mora a amizade  
não há rancor, nem falsidade,  
lá tem respeito, lá tem verdade,  
lá tem afeto, lá tem cumplicidade.”

Saulo Fernandes

## RESUMO

Surfactantes são espécies químicas, e suas moléculas possuem partes hidrofílicas e partes hidrofóbicas. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Apesar dos surfactantes serem amplamente utilizados nas indústrias, eles causam danos ao meio ambiente, por isso se tem a necessidade de substituí-los por produtos com as mesmas propriedades e que não sejam tão nocivos ao ambiente. Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados bio surfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Com o objetivo de estudar a produção de bio surfactante, o presente trabalho avalia dois microrganismos, uma cepa de *Aureobasidium pullulans* e uma de *Bacillus subtilis* utilizando dois diferentes tipos de biorreatore, um reator de agitação mecânica (STR) e um biorreatore airlift. A biomassa e o índice de emulsificação e tensão superficial do bio surfactante são determinadas a fim de qualificar o bioproduto. Os resultados mostram que a cepa de *Aureobasidium pullulans* estudada produz um bioemulsionante (não reduz a tensão superficial) e a cepa de *Bacillus subtilis* produz o bio surfactante (surfactina), produto de interesse, sendo este capaz de reduzir de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ , aproximadamente, a tensão superficial da água. O bio surfactante também se mostrou estável, pois pouco variou suas propriedades frente às variações de pH, força iônica e temperatura. Assim, é possível a sua aplicação industrialmente.

**Palavras-chave:** *Aureobasidium pullulans*. *Bacillus subtilis*. Reator de agitação mecânica. Reator airlift. Surfactina.

## ABSTRACT

Surfactants are chemical species, and their molecules have hydrophilic parts and hydrophobic parts. The vast majority of commercially available surfactants are synthesized from petroleum derivatives. Although, surfactants are widely used in the industries, they cause damage to the environment, so it is necessary to replace them with products with the same properties and that are not so harmful to the environment. The microbial compounds which exhibit surfactant properties, this is, reduce the surface tension and have high emulsifying capacity, are termed biosurfactants and consist of metabolic byproducts of bacteria, fungi and yeast. In order to study the production of biosurfactant, the present work evaluated two microorganisms, a strain of *Aureobasidium pullulans* and one of *Bacillus subtilis* using two different types of bioreactor, a mechanical agitation reactor (STR) and an airlift bioreactor. The biomass and the emulsification and surface tension index of the biosurfactant are determined in order to qualify the bioproduct. The results show that the studied strain of *Aureobasidium pullulans* produces a bioemulsifier (does not reduce the surface tension) and the *Bacillus subtilis* strain produces the biosurfactant (surfactin), product of interest, being able to reduce from 72 mN.m<sup>-1</sup> to 30 mN.m<sup>-1</sup>, approximately, the surface tension of the water. The biosurfactant was also stable, as it did not vary its properties in face of variations of pH, ionic strength and temperature. Thus, it is possible to apply industrially.

**Keywords:** *Aureobasidium pullulans*. *Bacillus subtilis*. Mechanical agitation reactor. Airliftbioreactor. Surfactin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da surfactina .....	21
Figura 2 – Visão geral de um biorreator de agitação mecânica.....	22
Figura 3 – Desenho esquemático de um airlift de circulação interna.....	23
Figura 4 – Reator de agitação mecânica (a) e reator airlift (b).....	27
Figura 5 – Ilustração do procedimento da propagação do inóculo.....	31
Figura 6 – Configuração do biorreator utilizado.....	32
Figura 7 – Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do <i>Aureobasidumpullulans</i> URM 7053 em shaker a 30°C e 200 rpm com diferentes concentrações iniciais de inóculo.....	36
Figura 8 – Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do <i>Aureobasidumpullulans</i> URM 7053 em shaker a 30°C e 200 rpm com inóculo adaptado ao meio de produção.....	37
Figura 9 – Produção de bioemulsionante em reator de agitação mecânica a 28°C, 350 rpm e aeração de 0,5 vvm durante 120 h de fermentação.....	39
Figura 10 – Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do <i>Aureobasidumpullulans</i> URM 7053 em biorreator de agitação mecânica a 28°C, 350 rpm e aeração de 0,5 vvm.....	40
Figura 11 – Produção de bioemulsionante em biorreator airlift a 28°C e aeração de 2,0 vvm durante 120 h de fermentação.....	42
Figura 12 – Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do <i>Aureobasidumpullulans</i> URM 7053 em biorreator airlift a 28°C e aeração de 2,0 vvm.....	43
Figura 13 – Produção de biosurfactante pela cepa <i>Bacillussubtilis</i> ICA56 em meio mineral em reator tanque agitado, 150 rpm e 30°C: Crescimento celular (■) e formação de produto (▲).....	45

Figura 14 – Comportamento da tensão superficial e do pH durante o cultivo da cepa ICA 56.....	46
Figura 15 – Emulsão formada entre solução rica em biosurfactante bruto e algumas fontes hidrofóbicas.....	47
Figura 16 – Medida da tensão superficial da solução rica em biosurfactante bruto na fermentação da cepa ICA 56 em reator airlift com 2,0 vvm de aeração e pH não controlado .....	48
Figura 17 – Comportamento da tensão superficial da solução rica em biosurfactante bruto ao controlar o pH em 7,0 e aeração de 2,0 vvm .....	49
Figura 18 – Comportamento da tensão superficial com pH controlado e aeração de 2,5 vvm .....	50
Figura 19 – Comportamento da tensão superficial da solução rica em biosurfactante bruto no processo com controle de pH e aeração de 3,5 vvm .....	51
Figura 20 – Comportamento da tensão superficial do biosurfactante bruto frente às variações de pH .....	52
Figura 21 – Efeito da variação da temperatura na tensão superficial da solução de biosurfactante bruto .....	53
Figura 22 – Comportamento da tensão superficial da solução rica em biosurfactante bruto conforme a variação de concentração salina.	54
Figura 1A – Curva padrão para identificação da concentração de biomassa do microrganismo <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053 .....	61
Figura 2A – Curva padrão para identificação da concentração de biomassa do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56 .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais classes de biossurfactantes.....	18
Tabela 2	– Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	19
Tabela 3	– Composição do meio YPD.....	26
Tabela 4	– Composição do meio de produção.....	26
Tabela 5	– Condições de cultivo em reator batelada.....	28
Tabela 6	– Composição do meio APGE.....	29
Tabela 7	– Composição do meio mineral.....	29
Tabela 8	– Composição da solução de micronutrientes.....	30
Tabela 9	– Composição do meio mineral contendo glicerol.....	32
Tabela 10	– Volume de ar injetado no biorreator durante o processo.....	33
Tabela 11	– Condições de cultivo em reator batelada.....	38
Tabela 12	– Produção de biomassa ao longo da fermentação do <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053 no biorreator de agitação mecânica a 28°C com agitação de 350 rpm sem aeração.....	38
Tabela 13	– Variação do pH e produção de biomassa ao longo da fermentação do <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053 no biorreator de agitação mecânica a 28°C com agitação de 350 rpm e aeração de 0,5 vvm.....	39
Tabela 14	– Células viáveis e pH ao longo da fermentação do <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053 no biorreator de agitação mecânica a 28°C com aeração de 0,5 vvm sem agitação.....	41
Tabela 15	– Variação do pH e produção de biomassa ao longo da fermentação do <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053 em biorreator airlift a 28°C e aeração de 2,0 vvm.....	42
Tabela 16	– Média tensão superficial do caldo fermentado livre de células obtido na fermentação do microrganismo <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7053 em ratorairlift.....	44

Tabela 17 – Índice de emulsificação (E24) do biossurfactante produzido frente algumas fontes hidrofóbicas.....	47
---	----

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

RPM	Rotações por minuto
STR	Reator perfeitamente agitado
Vvm	Volume de ar que será injetado no meio de cultura pelo volume do meio de cultura por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
E <sub>24</sub>	Índice de emulsão
H <sub>emulsão</sub>	Altura da emulsão
H <sub>t</sub>	Altura total
°C	Graus celcius
mL	Mililitros
%	Porcentagem
v/v	Volume por volume
L	Litros
L/min	Litros por minuto
40x	40 vezes
g/L	Gramas por litro
M	Molar
DO	Densidade óptica
nm	Nanometros
g	Força gravitacional
m/v	Massa por volume
h	Horas
mN.m <sup>-1</sup>	MiliNewton por metro

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	16
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	18
2.1	<b>Surfactante sintético .....</b>	20
2.2	<b>Bioemulsionantes.....</b>	20
2.3	<b>Biossurfactantes.....</b>	20
2.4	<b>Surfactina.....</b>	21
2.5	<b>Reator de agitação mecânica.....</b>	21
2.6	<b>Biorreatore airlift.....</b>	22
2.7	<b><i>Aureobasidum pullulans URM 7053.....</i></b>	23
2.8	<b><i>Bacillus subtilis ICA 56.....</i></b>	23
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	24
4	<b>METODOLOGIA.....</b>	25
4.1	<b>Obtenção dos microorganismos.....</b>	25
4.2	<b><i>Aureobasidum pullulans URM 7053.....</i></b>	25
4.2.1	<b><i>Ativação do microorganismo e preparo do estoque.....</i></b>	25
4.2.2	<b><i>Preparação do inóculo.....</i></b>	26
4.2.3	<b><i>Avaliação das condições de Inoculação.....</i></b>	26
4.2.4	<b><i>Produção em biorreatore.....</i></b>	27
4.3	<b><i>Bacillus subtilis ICA 56.....</i></b>	28
4.3.1	<b><i>Meio de manutenção e estoque do microrganismo.....</i></b>	29
4.3.2	<b><i>Preparo do inoculo.....</i></b>	29
4.3.3	<b><i>Propagação do inóculo.....</i></b>	30
4.3.4	<b><i>Produção em biorreatore.....</i></b>	31
4.3.5	<b><i>Extração do biossurfactante produzido.....</i></b>	33
4.4	<b>Métodos Analíticos.....</b>	33
4.4.1	<b><i>Determinação Concentração de Biomassa e Contagem de Viáveis.....</i></b>	33
4.4.2	<b><i>Avaliação do pH .....</i></b>	34
4.4.3	<b><i>Tensão superficial.....</i></b>	34

<b>4.4.5</b>	<b>Estabilidade frente variações de pH, temperatura e concentrações salinas .....</b>	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	36
<b>5.1</b>	<b><i>Aureobasidum pullulans URM 7053</i>.....</b>	36
<b>5.1.1</b>	<b>Avaliação das condições de inoculação.....</b>	36
<b>5.1.2</b>	<b>Produção do bioemulsionante em Biorreator de agitação mecânica.....</b>	38
<b>5.1.3</b>	<b>Produção do bioemulsionante em Biorreator Airlift.....</b>	42
<b>5.2</b>	<b><i>Bacillus subtilis ICA 56</i>.....</b>	44
<b>5.2.1</b>	<b>Produção de biossurfactante em reator de agitação mecânica.....</b>	44
<b>5.2.2</b>	<b>Estudo das propriedades tensoativas do biossurfactante produzido.....</b>	46
<b>5.2.3</b>	<b>Avaliação da capacidade emulsificante do bioproduto formado.....</b>	47
<b>5.2.4</b>	<b>Produção de biossurfactante em reator airlift.....</b>	48
<b>5.2.5</b>	<b>Estabilidade das propriedades tensoativas e emulsificantes frente a variações de pH, temperatura e força iônica (% NaCl).....</b>	51
<b>5.2.5.1</b>	<b>Efeito do pH.....</b>	52
<b>5.2.5.2</b>	<b>Efeito da temperatura.....</b>	53
<b>5.2.5.3</b>	<b>Efeito da força iônica.....</b>	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	56
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	57
	<b>ANEXO A – CURVA PADRÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DO MICRORGANISMO <i>Aureobasidum pullulansURM 7053</i>.....</b>	61
	<b>ANEXOB – CURVA PADRÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DO MICRORGANISMO <i>Bacillus subtilisICA 56</i>.....</b>	62

## 1 INTRODUÇÃO

Surfactantes, também conhecidos como tensoativos, são compostos orgânicos anfipáticos, ou seja, suas moléculas apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A porção polar, ou cabeça, pode apresentar grupos iônicos (cátions ou ânions), não iônicos ou anfóteros, que se comportam como ácido ou base dependendo do pH do meio (DALTIN, 2011). Os surfactantes são classificados em aniônicos, catiônicos, não iônicos ou anfóteros, de acordo com o grupo presente na parte polar (FELIPE; DIAS, 2017). Eles podem ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou bio surfactantes, produzidos por microrganismos. Alguns tipos de bio surfactantes são glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídis, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros.

Bio surfactantes, 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. O interesse na produção de bio surfactante deu-se devido a sua ampla gama de aplicações comerciais e suas vantagens em relações aos surfactantes sintéticos derivados do petróleo (SOARES, 2014). As novas legislações de controle do meio ambiente, a crescente preocupação ambiental dos consumidores e o aumento na produção desse bioproduto está levando a procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os bio surfactantes são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de tensoativo (PERREIRA *et al.*, 2013). Os bio surfactantes apresentam outras 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 às condições extremas de temperatura, pH e força iônica, e serem biodegradáveis no solo e na água (AL-WAHAIBI *et al.*, 2013).

O potencial de aplicação dos bio surfactantes produzidos a partir de microrganismos depende de suas propriedades funcionais, as quais podem ser emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição da corrosão, agente quelante, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Estas propriedades funcionais de cada bio surfactante podem variar

dependendo da composição do meio de cultivo e microrganismo utilizados, do mesmo modo que das condições operacionais, tais como tipo de biorreator, pH, temperatura, agitação e aeração do processo. A aplicabilidade dos 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 o principal mercado de interesse dos biossurfactantes (AL-BHARY *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2013). Isso ocorre devido ao aumento da solubilidade dos componentes do petróleo. O potencial de recuperação de derivados do petróleo deve-se a sua utilização na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos (LIMA, 1996).

Apesar de estas moléculas serem promissoras para diversas aplicações devido as suas características funcionais e vantagens, sua produção em escala industrial é dificultada devido ao elevado custo do processo. A viabilidade da utilização de biossurfactantes em ampla escala depende diretamente do desenvolvimento de processos mais baratos e que possam utilizar materiais renováveis e de baixo custo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta sessão traz aspectos teóricos importantes sobre os surfactantes sintéticos e os bio surfactantes: tipos, função, vantagens e desvantagens. Como também as técnicas utilizadas para produção. A Tabela 1 mostra alguns tipos de bio surfactantes e a Tabela 2 traz algumas funções dos bio surfactantes e seus campos de aplicação.

Tabela 1 – Principais classes de bio surfactantes

Tipo de Bio surfactante
<u>Glicolipídico</u>
Ramnolipídio
Soforolipídeo
<u>Trehalolipídeo</u>
<u>Lipopeptídeo e Lipoproteína</u>
Pepitídeo-lipídeo
Viscosina
Serrawetina
Surfactina
Subtilisina
Gramicidina
<u>Polimixina</u>
<u>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</u>
Ácidos graxos
Lipídeo neutro
<u>Fosfolipídeo</u>
<u>Surfactantes poliméricos</u>
Emulsan
biodispersan
Liposan
carboidrato-lipídio-proteína
manana-lipídio-proteína
<u>Surfactantes particulados</u>
Vesículas
Células

Fonte: Desai. eBanat (1997).

Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsionante e dispersante	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizante	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agente molhante e penetrante	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergente	Produtos de limpeza, agricultura
Agente espumante	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificante	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersante	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
<u>Agente de recuperação</u>	<u>Recuperação terciária de petróleo (MEOR)</u>

Fonte: Banat; Banat, Makkar e Cameotra (2000, com adaptações).

## 2.1 Surfactante sintético

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 compostos anfipáticos, ou seja, apresentam na molécula tanto um grupo hidrofílico como hidrofóbico.

## 2.2 Bioemulsionantes

São surfactantes produzidos por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (PAL *et al.*, 2009).

Biosurfactantes de alta massa molecular chamados de bioemulsionantes: polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas e biopolímeros, como complexos polissacarídeos-lipídios, os quais são mais eficientes na estabilidade de emulsões (ROSENBERG; RON, 1999; SAHARAN *et al.*, 2011).

Os bioemulsionantes ou bioemulsificantes têm possíveis aplicações na agricultura, em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e indústrias ambientais, devido às suas propriedades surfactantes eficazes, e também porque, em contraste com os surfactantes sintetizados quimicamente, eles são biodegradáveis e compatíveis com o meio ambiente (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; LIU *et al.*, 2010).

## 2.3 Biosurfactantes

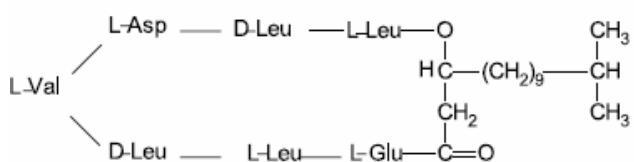
Os biosurfactantes são surfactantes produzidos por microrganismos, ou seja, moléculas com características tensoativas, isto é, tem o potencial de baixar a tensão superficial de líquidos (SANTOS; SILVA; COSTA, 2016), com vantagens em relação ao surfactante químico, pois são obtidos através de fontes renováveis, são biodegradáveis na água e no solo, apresentam baixa toxicidade e maior tolerância a temperatura, pH e força iônica.

## 2.4 Surfactina

Em 1968, Arima e colaboradores descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis* denominando-o surfactina (FÁBIO; PEREIRA; ROBERTO; MARIA, 2007). Esta é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m. (ESMERALDO, 2010).

Ao ser comparada com outros biosurfactantes, a surfactina se mostra mais capaz de reduzir a tensão superficial e interfacial. Na Figura 1 está representada a estrutura molecular da surfactina.

Figura 1– Estrutura molecular da surfactina

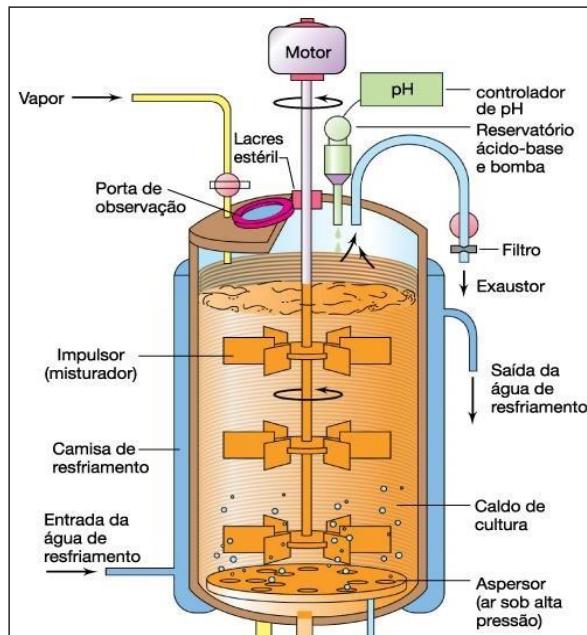


Fonte: Nitschke; Pastore, 2002.

## **2.5 Reator de agitação mecânica**

Os biorreatores de agitação mecânica são tanques com um agitador central ligado a um motor, que promove a agitação. Convencionalmente utilizados na indústria por gerarem baixos custos de operação. Em larga escala, são geralmente fabricados em aço inoxidável; em escala laboratorial, em vidro. Chicanas são acopladas aos tanques de modo a prevenir a formação de vórtice causado por altas frequências de agitação. Em vasos de diâmetro menor que 3 metros, são utilizadas 4 chicanas; para diâmetros maiores, 6 chicanas. Caso a altura do biorreator seja igual ao seu diâmetro, usualmente utiliza-se um agitador; se essa razão for maior, são necessários mais agitadores e a distância entre eles deve ser igual (NAJAFPOUR, 2007). A Figura 2 ilustra a visão geral de um biorreator de agitação mecânica.

Figura 2 – Visão geral de um biorreator de agitação mecânica

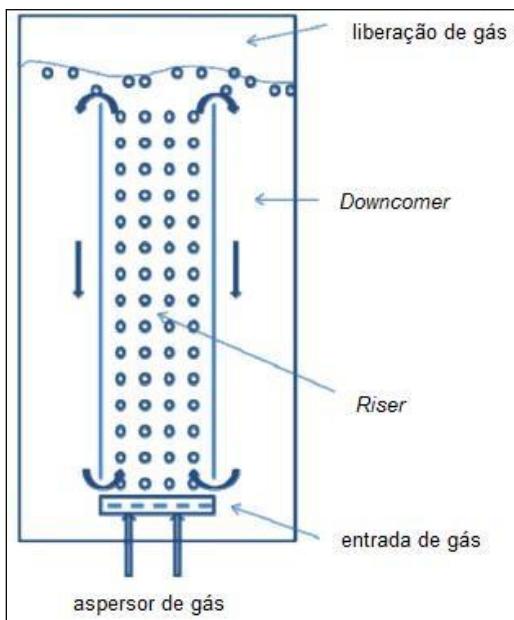


Fonte: Madiganet al. (2010).

## 2.6 Biorreator airlift

Os airlifts consistem em dois dutos verticais interligados, o duto de transporte (riser) é onde ocorre alimentação do gás, o outro duto é o de recirculação (downcomer), que é o responsável pela circulação do líquido de maneira interna ou externa à coluna. Esta circulação é consequência da força motriz originada através da diferença de densidade entre as regiões citadas anteriormente (RAMOS, 2014). Uma particularidade desse modelo de biorreator é que ele não possui agitador mecânico, a agitação dele é promovida pelo movimento de ar. A Figura 3 traz um esquema de um biorreator airlift com circulação interna.

Figura 3 – Desenho esquemático de um airlift de circulação interna



Fonte: Zimmerman et al. (2009, com adaptações).

## 2.7 *Aureobasidium pullulans*

Levedura com grande importância na biotecnologia, pois é potencial produtora de diferentes enzimas, pululanas e bioemulsionantes. Também amplamente utilizada no controle biológico de doenças de plantas, principalmente as doenças provenientes de armazenamento.

## 2.8 *Bacillus subtilis*

Bactéria de amplo espectro de utilização, sendo potencial produtora de enzimas e de proteínas, de biosurfactante, também pode atuar como adjuvantes vacinais e seus esporos são muito utilizados como probióticos.

### **3 OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de biossurfactante produzido por rota fermentativa com maior eficiência. Para isso foram utilizados dois microrganismos em dois modelos de biorreatores diferentes, a fim de otimizar o processo de produção de biossurfactante. Também foram avaliadas fontes alternativas de meio de produção a fim de utilizar rejeitos industriais para que diminuísse o descarte no meio ambiente e os custos do processo de produção.

## 4 METODOLOGIA

Neste tópico serão apresentadas a produção do biossurfactante e bioemulsionante e as metodologias empregadas nos processos de separação e/ou purificação destes.

### 4.1 Obtenção dos microrganismos

Foi utilizado o microrganismo *Aureobasidium pullulans* URM 7053 mantido congelado no Laboratório de Bioengenharia - Sistemas Microbianos do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio), localizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará. Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.

A outra cepa utilizada no presente trabalho foi o *Bacillus subtilis* ICA 56. 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.

### 4.2 *Aureobasidium pullulans* URM 7053

Neste tópico estarão descritas as metodologias utilizadas para a obtenção do bioproduto com uma cepa de levedura de *Aureobasidium pullulans*.

#### 4.2.1 Ativação do microrganismo e preparo do estoque

O meio YPD foi preparado, teve o pH ajustado para 5,5 e foi esterilizado a 121°C durante 15 min em autoclave. A ativação do *Aureobasidium pullulans* URM 7053, foi realizado inoculando-se o conteúdo de um eppendorf, onde havia 2 mL da cultura estoque, congelada a -20°C, em 50 mL de meio YPD, mostrado na Tabela 3. O crescimento do microrganismo foi conduzido a 30°C com agitação de 200 rpm no período de 24 h em agitador orbital(TECNAL,TE-420). Após esse tempo, o microrganismo foi repicado para o meio YPD a um volume correspondente a 10% do

volume do meio de cultura e novamente mantido a 30°C e 200 rpm durante 24h. Após o crescimento, obteve-se a cultura estoque do microrganismo que foi mantida congelada (-20°C) em solução de glicerol 40 % (v/v) em tubos contendo 5 mL cada.

Tabela 3 – Composição do meio YPD

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de Levedura	4
Glicose	10
Peptona	10

Fonte: elaborada pela autora.

#### **4.2.2 Preparação do inóculo**

O inóculo foi preparado adicionando-se o conteúdo de um tubo de cultura estoque em 50 mL do meio YPD (pH 5,5 e esterilizado a 121°C durante 15 min em autoclave) e o microrganismo foi incubado a 30°C sob agitação de 200 rpm, após 24h, o microrganismo foi repicado na proporção de 10% (v/v) para o meio de produção, descrito na Tabela 4, com pH ajustado para 5,5. O crescimento foi realizado também nas condições de 30°C, 200 rpm e 24h.

Tabela 4 – Composição do meio de produção

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Azeite de oliva	20
Extrato de Levedura	4
Glicose	1

Fonte: elaborada pela autora.

#### **4.2.3 Avaliação das condições de Inoculação**

Tendo como objetivo determinar as condições de inoculação do microrganismo foram realizados dois ensaios onde foram avaliadas a quantidade inicial de inóculo (Ensaio 1) e a adaptação do microrganismo ao meio de produção (Ensaio 2). No ensaio 1, a cultura estoque foi inoculada em 50 mL do meio YPD (pH 5,5 e esterilizado a 121°C durante 15 minutos) e o microrganismo foi incubado em agitador orbital a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após 24h, foram transferidas

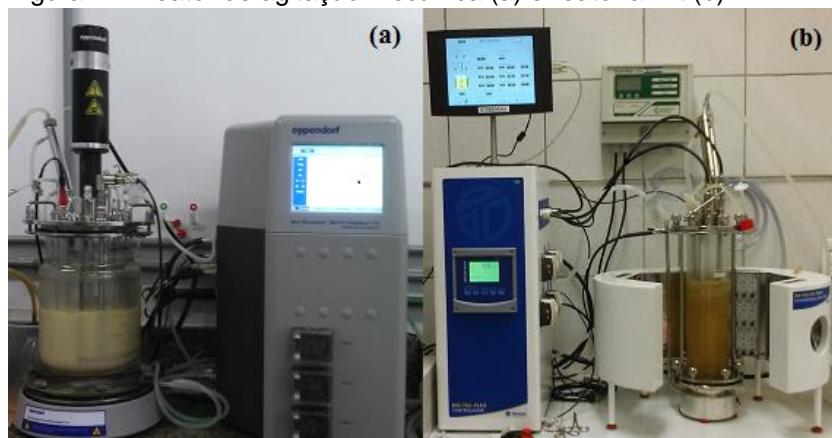
alíquotas do inóculo para erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de produção de modo a se obter as duas condições avaliadas: 10% de inóculo com densidade ótica inicial 0,4 (medida realizada em espectrofotômetro à 600 nm) e uma proporção de 10% de inóculo sem ajuste da densidade ótica

No ensaio 2, a cultura estoque foi inoculada em meio YPD e incubada em agitador orbital a 30°C sob agitação de 200 rpm durante 24 h. Após esse período, o microrganismo foi repicado na proporção de 10% (v/v) para o meio de produção e foi mantido por 24h em agitador orbital a 30°C e 200 rpm. Após 24 h, foi obtido o inóculo adaptado para ser utilizado no processo. Os ensaios foram realizados durante 120 h e foram coletadas amostras em intervalos de 24 h. As amostras foram submetidas à centrifugação (8000 rpm, 15 min) e o sobrenadante foi submetido as análises de tensão superficial e índice de emulsificação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.2.4 Produção em biorreator**

A partir dos resultados obtidos em agitador orbital, foram realizados testes de produção em dois tipos de biorreatores: um biorreator de agitação mecânica STR (stirred tank reactor), New Brunswick, modelo Bioflo®/Celligen® de 7L de volume útil (Figura 4.a), e um biorreator airlift, Tecnal, modelo cruzeta de 3L de volume útil (Figura 4.b). Cada biorreator era acoplado a um compressor de ar e sensores de temperatura, pH e oxigênio.

Figura 4 – Reator de agitação mecânica (a) e reator airlift (b)



Fonte: elaborada pela autora.

Os testes no biorreatore de agitação mecânica foram realizados em regime batelada simples com volume operacional de 3L onde foram avaliadas diferentes condições de cultivo, mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condição de cultivo em reator batelada

<b>Condições</b>	
<b>Aeração (vvm)</b>	<b>Agitação (rpm)</b>
0	350
0,5	350
0,5	0

Fonte: elaborada pela autora.

No biorreatore airlift, foi realizada uma fermentação com um volume operacional de 2,5L e aeração de 2,0 vvm (4,0 L/min).

Em todos os ensaios a cultura estoque foi ativada no meio YPD com pH ajustado para 5,5 (esterilizado a 121 °C durante 15 min em autoclave) e incubada em agitador orbital a 30°C com agitação de 200 rpm durante 24 h. Após esse período, o microrganismo foi repicado na proporção de 10% (v/v) para o meio de produção e foi mantido por 24h também em agitador orbital a 30°C e 200 rpm. Após 24 h, 10% (v/v) do inóculo adaptado foi adicionado ao biorreatore. A temperatura do processo nos biorreatores foi controlada e mantida em 28°C e foram realizadas medidas de pH. No biorreatore airlift foi adaptado um coletor de espuma, caso esta transborde durante as fermentações, composto por um frasco coletor conectado à saída de gases do biorreatore para reciclá-la para o biorreatore. Amostras foram coletadas a cada 24 h e centrifugadas a 8000 rpm durante 15 min, em centrífuga (SIGMA, 6-16KS). Foi determinada a concentração celular e sobrenadante foi submetido a análise de índice de emulsificação e tensão superficial.

#### **4.3 *Bacillus subtilis* ICA 56**

Neste tópico estarão descritas as metodologias utilizadas para a obtenção do bioproduto com uma cepa de *Bacillus subtilis* ICA 56.

#### **4.3.1 Meio de manutenção e estoque do microrganismo**

Avaliou-se o potencial de produção de biossurfactante pela cepa ICA56, proveniente de um manguezal no município de Icapuí, no estado do Ceará. Este microrganismo foi apresentado como possível produtor de biossurfactante por Lima (2013), por intermédio da identificação do gene sfp, responsável pela produção de surfactina (FRANÇA, 2013).

A manutenção da cepa foi realizada em meio APGE, descrito na Tabela 6. O meio APGE foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 min, distribuído em placas de Petri e tubos rosqueados, ambos estéreis, em capela microbiológica e incubado em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 h. A cultura foi mantida sob refrigeração a 4 °C e repicada a cada 30 dias (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Tabela 6 – Composição do meio APGE

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Ágar	15
Extrato de Levedura	2,5
Glicose	5
Peptona	5

Fonte: elaborada pela autora.

#### **4.3.2 Preparo do inóculo**

Na preparação do inóculo, utilizou-se meio mineral (Tabela 7), contendo glicose como fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 3,0 M e ácido clorídrico (HCl) 3,0 M. O meio mineral foi esterilizado à 110°C por 10 min em autoclave. A composição do meio mineral foi proposta por Barreto (2011), ao estudar microrganismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solos de manguezais (FRANÇA, 2013).

Tabela 7 – Composição do meio mineral

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de Levedura	5
Glicose	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6
NaCl	2,7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,2

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
Fonte: elaborada pela autora.	

O inóculo foi preparado repicando o microrganismo em placas de petri contendo meio APGE. A cepa foi incubada em estufa microbiológica a 30 °C por 24 h. Após este tempo, foram transferidas três alçadas da cultura da placa para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de propagação de inóculo. O frasco inoculado foi incubado em agitador orbital (Tecnal - TE240) a 30 °C e 150 rpm por aproximadamente 24 h. A Figura 5 ilustra como foi feita a propagação do inóculo.

#### 4.3.3 Propagação do inóculo

Para que houvesse uma padronização da concentração celular inicial dos experimentos, 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 7), assim como foi para o inóculo, mas foram adicionados 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes (Tabela 8).

Tabela 8 – Composição da solução de micronutrientes

Componente	Composição (g/L)
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,39
EDTA	2,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,54
$\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,17
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,95

Fonte: Morán et al. (2000).

Para realização dos ensaios, foram adicionados 10 % de inóculo diluído e com D.O. ajustada (aproximadamente 1,0), ao meio de cultivo, para um volume de fermentação 2,5L, em reator airlift. Todos os meios tiveram pH ajustado para 7,0 e foram esterilizados a 110 °C por 10 min em autoclave. (FRANÇA, 2013).

Figura 5 - Ilustração do procedimento de propagação do inóculo



Fonte: elaborado pela autora.

#### **4.3.4 Produção em biorreator**

Foi realizado um processo em reator tanque agitado nas condições de 150 rpm e 30°C UTI lizando meio mineral. A quantificação do bioproduto formado foi realizada por HPLC (*High performance liquid chromatography* - cromatografia líquida de alta eficiência).

A partir de resultados obtidos na literatura (FRANÇA, 2013), foram realizados ensaios em biorreator airlift (Tecnal, modelo cruzeta) de 3L de volume útil, Figura 6. 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, mostrou que esse substrato é viável para esse processo. A composição do meio de cultivo, em que Souza *et al.* (2012) obtiveram maior produção de biossurfactante, está representado na Tabela 9.

Figura 6 - Configuração do biorreatorairlift (Tecnal, modelo cruzeta) de 3L de volume útil utilizado



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 9 – Composição do meio mineral contendo glicerol

<b>Componente</b>	<b>Composição (g/L)</b>
Glicerol	20
Extrato de Levedura	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4

Fonte: Souza et al. (2012).

A cultura estoque da cepa ICA56 foi repicada em placa APGE e incubada a 30°C por 24 h. Após esse período, três alçadas foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio mineral. O frasco (inóculo) foi incubado em agitador orbital a 180 rpm, 30 °C por aproximadamente 24 h. Após este período, o inóculo foi adicionado ao biorreato, contendo 2,25 L de meio mineral estéril, contendo glicose como fonte de carbono e suplementado com 0,1% da solução de micronutrientes. As condições de aeração testadas estão apresentadas na Tabela 10. O processo foi conduzido a 30°C com pH ajustado e controlado a 7,0 em um período de 72 h, com amostragens realizadas durante a incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, aproximadamente, 4 °C por 15 min, com finalidade de remoção das células. O sobrenadante, livre de células, foi submetido às medidas de tensão superficial e

índice de emulsificação (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O excesso de espuma formada no ensaio foi introduzido no coletor de espuma (Figura 6), que foi conectado a saída de gases do biorreator. O líquido e parte da espuma acumulados no fundo do coletor de espuma foi reciclado para o fermentador através de uma bomba peristáltica. Nenhum agente antiespumante foi adicionado durante a fermentação, pois o produto de interesse também estava na espuma (FRANÇA, 2013).

Tabela 10 – Volume de ar injetado no biorreator durante o processo

<b>Aeração</b>	
<b>vvm</b>	<b>L/min</b>
2	4
2,5	5
3,5	7

Fonte: Elaborada pela autora.

#### **4.3.5 Extração do biosurfactante produzido**

Partindo de uma alíquota de 20 mL do caldo fermentado livre de células (sobrenadante), ajustou-se o pH para 2,0 com HCl 5M. A solução resultante permaneceu em repouso durante 12 h (overnight), a 4 °C para que ocorresse a precipitação da surfactina (e outros lipopeptídeos). Após este tempo, o caldo fermentado acidificado foi centrifugado a 10000 g, a 4 °C por 15 min. Este precipitado ao ser secado em estufa (a 50° C por 24 h), gera o biosurfactante bruto (PEREIRA *et al.*, 2013).

### **4.4 Métodos Analíticos**

Neste item são descritas as metodologias utilizadas para as análises necessárias para a caracterização do bioproduto.

#### *4.4.1 Determinação da Concentração de Biomassa e Contagem de Viáveis*

A biomassa celular foi estimada tanto por peso seco, onde o caldo fermentado foi centrifugado (8000 rpm, 15 min) e houve a lavagem das células. Em

seguida foi realizada a secagem em estufa de circulação de ar, a 60°C por 24 h para obter o peso constante (SANTOS, 1996).

A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer. A suspensão de levedura foi corada com azul de metileno para determinar as células viáveis expressas em cél/mL e observadas ao microscópio óptico na objetiva de 40x (Zeiss) (ANTONINI, 2004).

#### *4.4.2 Determinação do pH*

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de bancada (Tecnal, TEC-5), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

#### *4.4.3 Tensão superficial*

A atividade tensoativa do produto formado no cultivo da cepa ICA56 foi realizada pela medida das tensões superficiais, 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 do anel descrito por Costa *et al.*, (2006). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada e a análise foi realizada a temperatura ambiente.

Para mensurar a tensão superficial, utilizaram-se 30 mL de sobrenadante livre de células para cada amostra analisada. As análises foram realizadas em triplicata.

#### *4.4.4 Índice de emulsificação*

O índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Wei, Chou e Chang (2005). Foram adicionados 2,0 mL do meio fermentado livre de células (sobrenadante) e 2,0 mL de hexadecano a tubos de ensaio de fundo chato. A mistura foi agitada em vórtex durante 2 minutos em elevada rotação e mantida em repouso por 24 h. As análises foram conduzidas em triplicata. Após 24 h, calculou-se o índice de emulsificação de acordo com a Equação 1.

Onde:

$E_{24}$ = índice de emulsificação após 24h (%)

**H<sub>emulsão</sub>**= Altura da emulsão (cm)

**H<sub>t</sub>**= Altura total (cm)

#### 4.4.5 Estabilidade frente variações de pH, temperatura e concentrações salinas

Alguns campos de aplicação dos biossurfactantes dependem estreitamente que suas propriedades funcionais sejam estáveis frente às variações ambientais em que poderão ocorrer, tais como temperatura, pH e concentração salina (AL-BAHRY *et al.*, 2013).

A avaliação da estabilidade das propriedades tensoativas e emulsificantes do biosurfactante bruto foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Aparna *et al.*, (2012). Foram separadas alíquotas de solução do biosurfactante para serem expostas as diferentes condições de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12), temperatura (4, 25, 50, 75, 100 e 121 °C, por 30 min em forno mufla) e concentrações salinas (0; 2,5; 5, 10, 15 e 20 % m/v de NaCl) (FRANÇA, 2013). Posteriormente foram avaliadas as tensões superficiais. Estas análises foram realizadas em triplicata. Posteriormente foram avaliados as tensões superficiais e a capacidade emulsificante ( $E_{24}$ ) em óleo de motor e óleo de soja.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

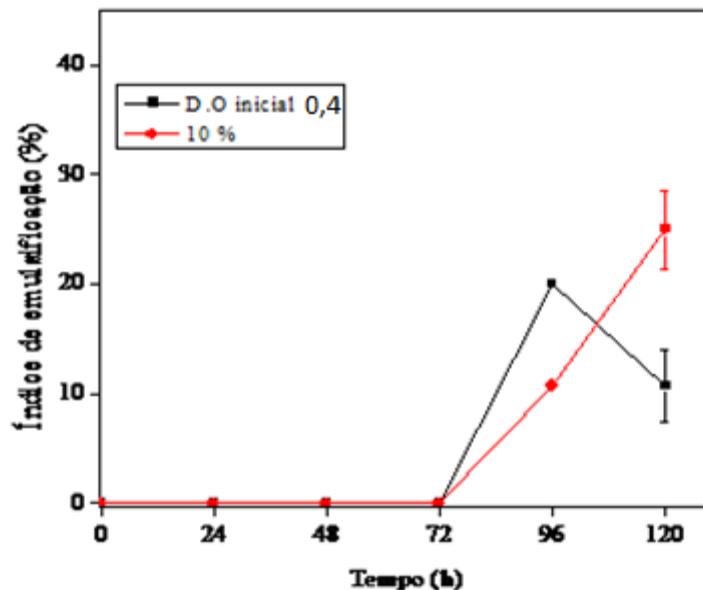
### 5.1 *Aureobasidum pullulans* URM 7053

Nesse item são discutidos os resultados obtidos com os ensaios utilizando o microrganismo *Aureobasidum pullulans* URM 7053.

#### 5.1.1 Avaliação das condições de inoculação

Alguns ensaios foram realizados para determinar as melhores condições de inoculação do microrganismo. A Figura 7 apresenta os resultados de Índice de emulsificação obtidos na determinação da quantidade inicial de inóculo onde foram avaliadas densidade ótica inicial 0,4 e uma proporção de 10% (v/v) de inóculo sem ajuste da densidade ótica.

Figura 7 - Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do *Aureobasidum pullulans* URM 7053 em shaker a 30°C e 200 rpm com diferentes concentrações iniciais de inóculo.



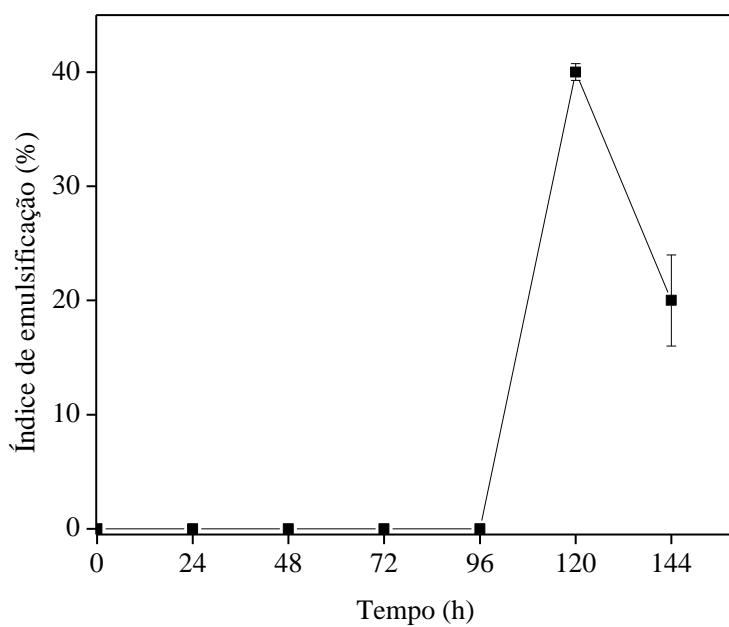
Fonte: elaborada pela autora.

A partir dos resultados apresentados na Figura 7 podemos observar que houve a produção de bioemulsionante a partir de 96 h de fermentação nas

condições avaliadas. O maior de índice de emulsificação (25%) foi obtido em 120 h de fermentação quando se utilizou uma concentração inicial de inóculo de 10%.

O produto é considerado um bom emulsionante quando é capaz de formar emulsão com o hidrocarboneto que se mantenha acima de 50% por 24h ou mais (WILLUMSEN; KARLSON, 1997). O biossurfactante além das características do bioemulsionante, também reduz a tensão superficial. Como os valores de índice de emulsificação obtidos foram metade dos valores considerados satisfatórios, foi realizado um ensaio de adaptação do microrganismo ao meio de produção visando melhorar a produção do bioemulsionante. A Figura 8 apresenta os resultados de Índice de emulsificação obtidos na fermentação com a utilização do inóculo adaptado ao meio de produção.

Figura 8 - Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do *Aureobasidium pullulans* URM 7053 em shaker a 30°C e 200 rpm com inóculo adaptado ao meio de produção



Fonte: elaborada pela autora.

Analizando a Figura 8, observa-se que a produção do bioemulsionante foi favorecida com a adaptação do microrganismo ao meio de produção, pois essa etapa de adaptação proporcionou um aumento do índice de emulsificação para 40,01% em 120 h de processo. A partir dos resultados obtidos, a preparação do inóculo para a produção do bioemulsionante foi padronizada em uma proporção de 10% (v/v) de inoculo com a adição da etapa de adaptação.

### **5.1.2 Produção do bioemulsionante em Biorreator de agitação mecânica**

No biorreator de agitação mecânica (STR) foram avaliadas três diferentes condições de cultivo, descritas na Tabela 11.

Tabela 11 – Condições de cultivo em reator batelada

<b>Condições</b>	
<b>Aeração (vvm)</b>	<b>Agitação (rpm)</b>
0	350
0,5	350
0,5	0

Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados de biomassa utilizando o método de peso seco obtidos na fermentação realizada no biorreator de agitação mecânica na condição de agitação de 350 rpm e sem aeração, em um período de 120 h estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Produção de biomassa ao longo da fermentação do *Aureobasidium pullulans* URM 7053 no biorreator de agitação mecânica a 28°C com agitação de 350 rpm sem aeração.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
0	12,89 ± 0,32
24	15,78 ± 2,04
48	27,62 ± 3,38

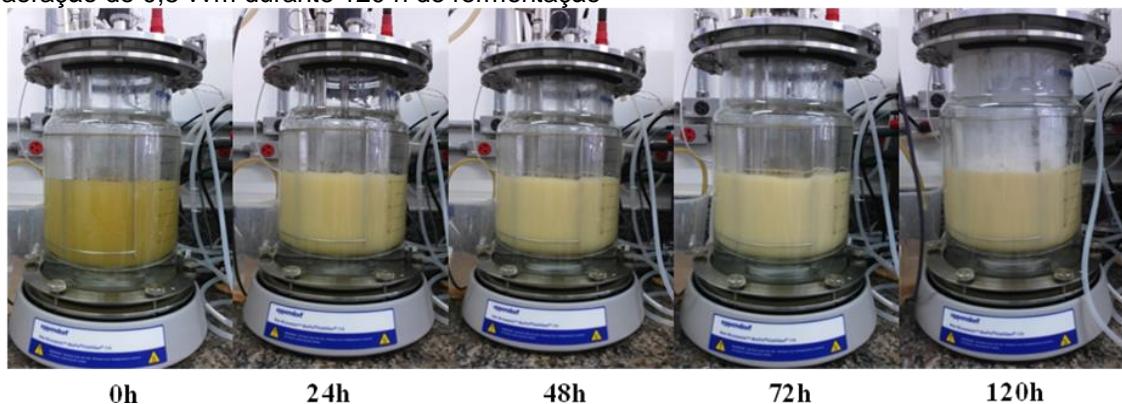
Fonte: elaborada pela autora.

A Tabela 12 apresenta os resultados de biomassa somente até 48 h de fermentação porque a metodologia usada foi a de peso seco e, como o meio de produção havia grande quantidade (20 g/L) de azeite de oliva na sua composição, a partir de 72 h esse azeite interferiu na determinação da biomassa impossibilitando sua secagem completa. Diante dos resultados podemos observar que houve um aumento do crescimento microbiano ao longo do tempo. Entretanto, não houve formação do bioemulsionante e isso pode ter ocorrido devido à ausência da aeração durante a fermentação, pois, segundo Amaral *et al.* (2010), agitação e aeração são fatores importantes que influenciam a produção de biosurfactante, uma vez que facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa.

Tendo em vista que a fermentação em biorreator sem aeração não possibilitou a produção do bioemulsionante, foi realizada uma fermentação no mesmo biorreator de agitação mecânica com aeração de 0,5 vvm (1,5L/min) e agitação de 350 rpm.

A Figura 9 mostra a turvação do meio e a formação de espuma ao longo da fermentação.

Figura 9 - Produção de bioemulsionante em reator de agitação mecânica a 28°C, 350 rpm e aeração de 0,5 vvm durante 120 h de fermentação



Fonte: elaborada pela autora.

A Tabela 13 e a Figura 10 apresentam os resultados de pH, biomassa (por peso seco) e índice de emulsão obtidos na fermentação realizada no biorreator de agitação mecânica com agitação de 350 rpm e aeração de 0,5 vvm por 120h.

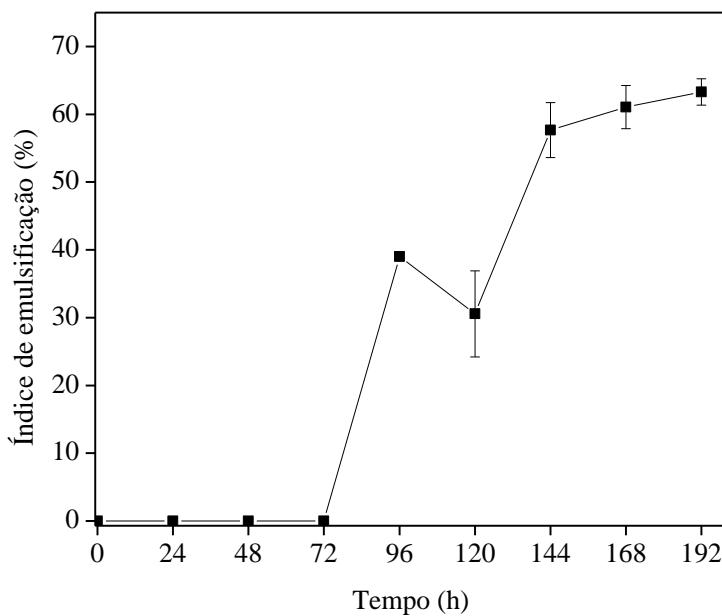
Tabela 13 - Variação do pH e produção de biomassa ao longo da fermentação do *Aureobasidium pullulans* URM 7053 no biorreator de agitação mecânica a 28°C com agitação de 350 rpm e aeração de 0,5 vvm

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
0	5,80	3,85 ± 0,95
24	6,60	5,50 ± 0,96
48	6,80	3,03 ± 0,05
72	7,35	4,65 ± 0,18
96	7,28	3,51 ± 0,31
120	7,29	4,63 ± 0,22
144	7,60	3,23 ± 0,18
168	7,68	2,69 ± 0,12
192	8,03	2,66 ± 0,24

Fonte: elaborada pela autora.

Observa-se que ao longo da fermentação que houve o aumento do pH. Entretanto, não houve muita variação no crescimento da biomassa (que foi determinada por massa seca) e sua maior concentração foi obtida em 24 h de fermentação. Não foi possível observar as fases de crescimento do microrganismo a partir dos resultados de biomassa obtidos durante a fermentação e isso pode ter ocorrido devido à presença de resíduos do azeite de oliva, que causou interferência na metodologia de determinação da biomassa por peso seco, pois se formava uma película de azeite impedindo a secagem da biomassa. Diante disso, nas fermentações seguintes a quantificação do crescimento do *Aureobasidium pullulans* URM 7053 foi realizada através de contagem por câmara de Neubauer.

Figura 10 - Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do *Aureobasidium pullulans* URM 7053 em biorreator de agitação mecânica a 28°C, 350 rpm e aeração de 0,5 vvm



Fonte: elaborada pela autora.

A utilização da aeração de 0,5 vvm contribuiu para a produção do bioemulsionante (Figura 10) que foi formado a partir de 96 h de fermentação alcançando um índice de emulsificação de  $63,29 \pm 1,94\%$  em 192 h de processo, demonstrando que o bioemulsionante apresentou boa capacidade de formar emulsão, segundo Willumsen e Karlson(1997). Este resultado está de acordo com o obtido por Gudiña *et al.* (2015) que estudou a produção de bioemulsionante por *Paenibacillus sp.* isolado de óleo não refinado e obteve  $64,4 \pm 1,6\%$  de índice de

emulsão quando o microrganismo cresceu em condições aeróbicas na presença de parafina. Durante os ensaios em biorreator, quando coletamos amostra do caldo fermentado e fizemos o teste de índice de emulsificação não foi formada emulsão. A emulsão obtida foi resultante da amostra coletada na espuma formada durante a fermentação. Foi realizado um ensaio no biorreator de agitação mecânica com aeração de 0,5 vvm na ausência de agitação e os resultados de pH e células viáveis obtidos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Células viáveis e pH ao longo da fermentação do *Aureobasidum pullulans* URM 7053 no biorreator de agitação mecânica a 28°C com aeração de 0,5 vvm sem agitação

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Células viáveis (cél/mL)</b>
0	5,80	$5,85 \times 10^6$
24	6,60	$4,95 \times 10^7$
48	6,80	$3,20 \times 10^7$
72	7,35	$2,95 \times 10^7$
96	7,28	$5,85 \times 10^7$
120	7,29	$5,85 \times 10^7$
144	7,60	$4,15 \times 10^7$
168	7,68	$6,15 \times 10^7$
192	8,03	$5,90 \times 10^7$

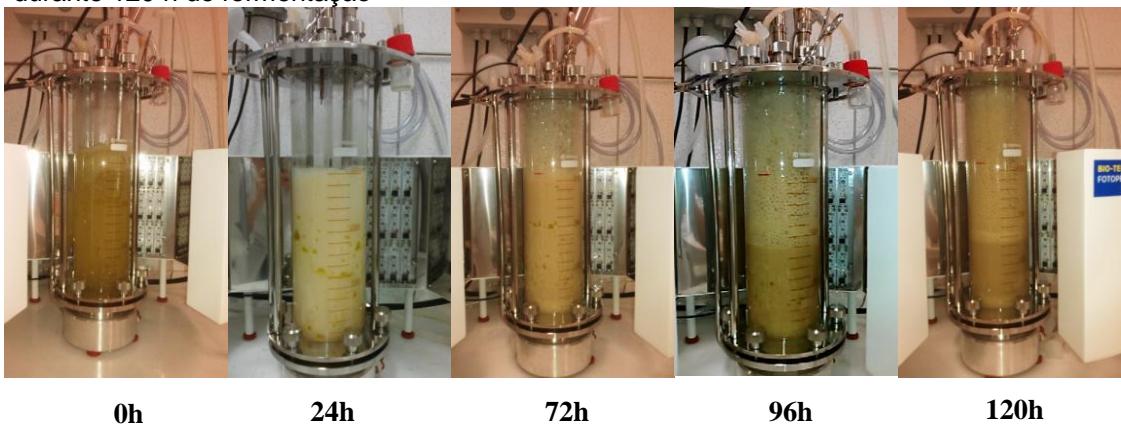
Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram que houve um aumento no pH, atingindo um valor de 8,03 no final da fermentação. Também podemos observar que houve uma diminuição do crescimento microbiano até 72 h de fermentação que pode ter sido causada pela ausência da agitação ou porque ao retirar a alíquota para análises, o caldo fermentativo não estava homogêneo. A partir de 48 h de fermentação, foi verificado que a biomassa microbiana ficou decantada na dorna e por esse motivo foi iniciada uma agitação de 350 rpm. Após iniciar a agitação foi observado que houve um aumento de biomassa. Entretanto, não houve produção do bioemulsionante. Diante dos resultados obtidos no biorreator de agitação mecânica, podemos concluir que a melhor condição para a produção do bioemulsionante foi a fermentação com agitação de 350 rpm e aeração de 0,5 vvm. Além disso, foi verificado que no biorreator foi obtido um índice de emulsificação mais elevado quando comparado aos ensaios em agitador orbital.

### 5.1.3 Produção do bioemulsionante em Biorreactor Airlift

No biorreactor airlift foi realizada uma fermentação nas condições de 28° C com aeração de 2,0 vvm (4,0 L/min) durante 120 h. A Figura 11 mostra a turvação do meio e a formação de espuma ao longo da fermentação.

Figura 11 - Produção de bioemulsionante em biorreactor airlift a 28°C e aeração de 2,0 vvm durante 120 h de fermentação



Fonte: elaborada pela autora.

Na Tabela 15 e na Figura 12 são mostrados os resultados obtidos para pH e biomassa (por contagem de células viáveis) e índice de emulsão e tensão superficial obtidos na fermentação realizada no biorreactor airlift com aeração de 2,0 vvm durante 120h respectivamente.

Tabela 15 - Variação do pH e produção de biomassa ao longo da fermentação do *Aureobasidum pullulans* URM 7053 em biorreactor airlift a 28°C e aeração de 2,0 vvm

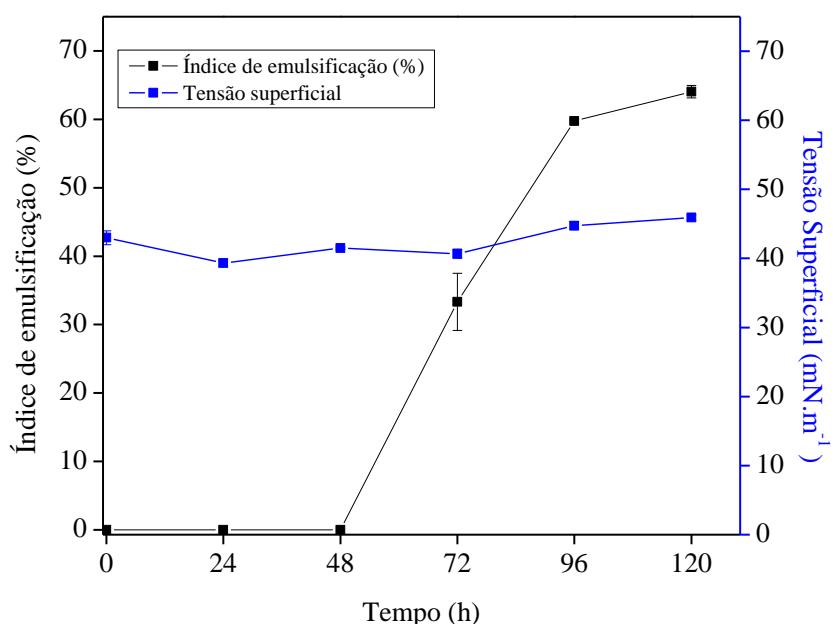
Tempo (h)	pH	Células viáveis (cél/mL)
0	5,91	$3,05 \times 10^6$
24	7,08	$4,38 \times 10^7$
48	6,24	$5,30 \times 10^7$
72	6,02	$5,53 \times 10^7$
96	5,41	$8,05 \times 10^7$
120	5,51	$6,33 \times 10^7$

Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que a variação do pH ao longo da fermentação foi pequena, visto que no início do ensaio o pH era 5,91 e em 120 h de processo obteve-se um pH 5,51 (mesmo havendo um aumento do pH para 7,08 em 24 h de processo). Esse comportamento foi diferente do que

aconteceu no reator de agitação mecânica a 350 rpm e 0,5 vvm de aeração onde obteve-se o pH de 8,03 no final da fermentação. Podemos observar que houve um aumento do crescimento celular ao longo do tempo alcançando  $6,33 \times 10^7$  cel/mL em 120 h de fermentação.

Figura 12 - Índice de emulsificação do bioemulsionante obtido na fermentação do *Aureobasidium pullulans* URM 7053 em biorreator airlift a 28°C e aeração de 2,0 vvm



Fonte: elaborada pela autora.

No reator airlift, o bioemulsionante produzido pela levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7053 apresentou boa capacidade emulsionante alcançando um valor de índice de emulsificação de  $64,04 \pm 0,89\%$  em 120 h de processo. A Tabela 16 mostra o resultado da medida da tensão superficial do caldo fermentado livre de células. A medida foi realizada em triplicata.

Tabela 16 - Média tensão superficial do caldo fermentado livre de células obtido na fermentação do microrganismo *Aureobasidium pullulans* URM 7053 em biorreactor airlift

Tempo (h)	Tensão superficial (mN/m)
0	43
24	39
48	40
72	40
96	45
120	46

Fonte: elaborada pela autora.

Vale ressaltar que no biorreatore airlift a emulsão obtida foi resultante da amostra coletada diretamente do caldo bruto durante a fermentação, diferente do biorreatore de agitação mecânica onde houve uma menor quantidade de bioemulsionante coletada, pois o mesmo se apresentava majoritariamente na espuma que se encontrava na parte superior do líquido.

Podemos observar na Figura 12 e na Tabela 16 que não houve uma variação significativa da tensão superficial ao longo do tempo. No início da fermentação a tensão superficial era  $43 \pm 1 \text{ mN.m}^{-1}$  e em 120 h foi obtida uma tensão superficial de  $45,92 \pm 0,42 \text{ mN.m}^{-1}$ . Segundo Amaral *et al.* (2010) os microrganismos são capazes de produzir dois tipos principais de compostos tensoativos: os biosurfactantes que reduzem significativamente a tensão superficial da água (a tensão superficial da água destilada é aproximadamente  $73 \text{ mN.m}^{-1}$ ) e os bioemulsionantes que apesar de não reduzirem tanto a tensão de superfície são capazes de estabilizar emulsões óleo em água. Diante disso podemos verificar que o *Aureobasidium pullulans* URM 7053 produziu um bioemulsionante pois o mesmo não reduziu a tensão superficial mas apresentou boa capacidade para formar emulsão.

Diante dos resultados obtidos neste estudo observamos que a utilização do biorreatore airlift foi mais vantajosa, pois o índice de emulsificação máximo foi obtido em 120 h de processo enquanto no biorreatore de agitação mecânica o valor máximo de índice de emulsificação foi alcançado em 192 h de fermentação.

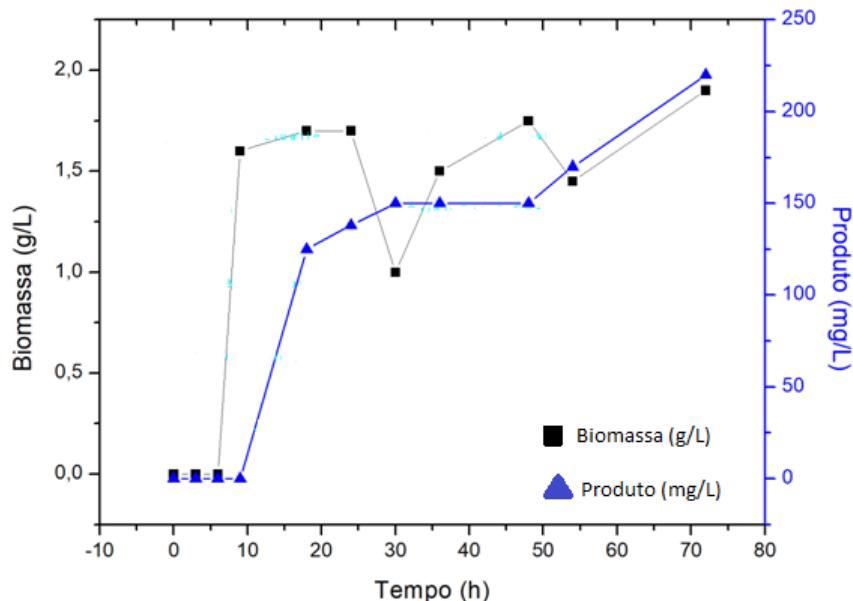
## 5.2 *Bacillus subtilis* ICA 56

Neste tópico serão discutidos os resultados obtidos nos testes realizados com o microrganismo *Bacillus subtilis* ICA 56.

### 5.2.1 Produção de biossurfactante em reator de agitação mecânica

Iniciando os testes com uma cepa da bactéria *Bacillus subtilis* ICA 56, foi realizado um ensaio em reator tanque agitado para avaliar a produção de biossurfactante em meio mineral (Tabela 7, Seção 3.3.2). A Figura 13 mostra os resultados obtidos de formação de produto e crescimento celular durante o cultivo do microrganismo.

Figura 13 - Produção de biossurfactante pela cepa *Bacillus subtilis* ICA56 em meio mineral em reator tanque agitado, 150 rpm e 30°C: Crescimento celular (■) e formação de produto (▲)

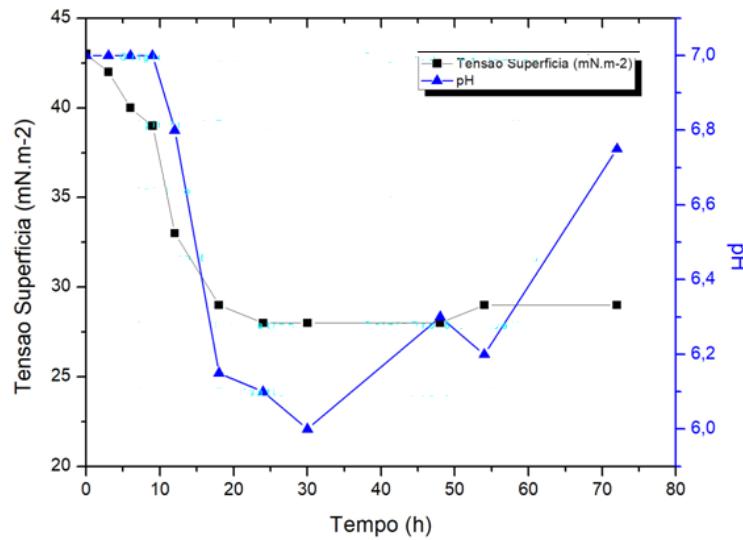


Fonte: elaborada pela autora.

Observou-se o início da fase estacionária do crescimento microbiano em 10 h de cultivo, enquanto a maior produção de surfactina (aproximadamente 220 mg / L) ocorreu em 72 h de fermentação.

A análise de tensão superficial do caldo fermentado foi realizada durante o cultivo da cepa ICA 56 como uma medida indireta da quantidade e qualidade do biossurfactante produzido, pois estas biomoléculas apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial de líquidos (COUTTÉ *et al.*, 2013; AL-WAHABI *et al.*, 2013; GUDIÑA *et al.*, 2010). A Figura 14 apresenta o comportamento da tensão superficial e do pH durante o cultivo.

Figura 14 - Comportamento da tensão superficial e do pH durante o cultivo da cepa ICA 56



Fonte: elaborada pela autora.

A tensão superficial do caldo fermentado livre de células foi reduzida de 44 para 28 mN.m<sup>-1</sup> (aproximadamente 35 % de redução) a partir e 18 h de processo, mostrando a eficiência do tensoativo produzido pela cepa ICA 56. Esta redução apresentou-se similar ao observado por Giro *et al.* (2009), que utilizou meio mineral para cultivar *Bacillus subtilis* LAMI005, entretanto obteve uma redução da tensão superficial de aproximadamente 40,3 % em 48 h de processo.

### 5.2.2 Estudo das propriedades tensoativas do biosurfactante produzido

Um tensoativo é considerado eficaz quando é capaz de reduzir a tensão superficial, que é definida 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 (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 é reduzida (PIROLLO, 2006).

Estas biomoléculas são capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos (NITSHIKE *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Um dos critérios utilizados para a seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes é a capacidade de reduzir a tensão superficial da água para valores abaixo de 35 mN.m<sup>-1</sup> (MULLINGAN *et al.*, 2005).

Ao adicionar o caldo fermentado livre de células contendo o biossurfactante em água, produzido pela cepa ICA56 em meio mineral, a tensão superficial da água foi reduzida de 72 para  $33 \text{ mN.m}^{-1}$ , equivalendo a uma redução de 54%, mostrando, assim, a eficiência do bioproduto obtido como um tensoativo em potencial (FRANÇA, 2013).

### **5.2.3 Avaliação da capacidade emulsificante do bioproduto formado**

A capacidade emulsificante do biossurfactante bruto em formar emulsões estáveis, foi avaliada nas seguintes fontes hidrofóbicas: querosene, hexadecano, hexano, gasolina e óleo de motor SAE 15W40. A Tabela 17 apresenta os valores obtidos de índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) enquanto a Figura 15 mostra imagens das emulsões formadas entre a solução de biossurfactante bruto e algumas fontes hidrofóbicas.

Tabela 17 - Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) do biossurfactante produzido frente algumas fontes hidrofóbicas

Fonte Hidrofóbica	$E_{24}(\%)$
Gasolina	$46,4 \pm 0,00$
Hexano	$61,7 \pm 0,02$
Óleo de motor	$77,9 \pm 0,01$
Querosene	$61,9 \pm 0,07$

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 15 - Emulsão formada entre solução rica em biossurfactante bruto e algumas fontes hidrofóbicas



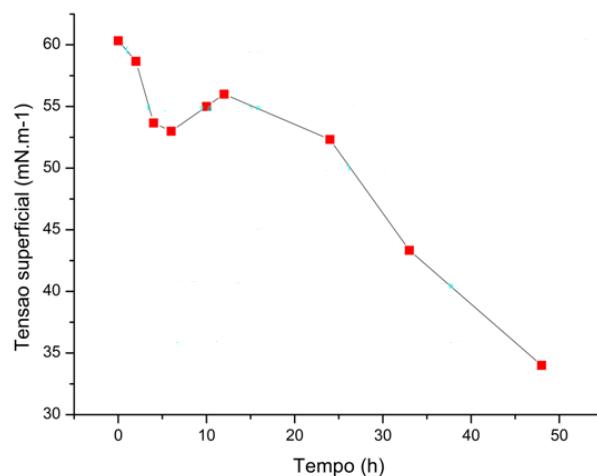
Fonte: França, 2013.

Pode-se observar na Tabela 17 que o biosurfactante produzido foi capaz de produzir emulsões estáveis, pois, segundo Bezerra (2012), um dos critérios a serem analisados para considerar um emulsificante como eficiente é que ele apresente capacidade de formar emulsão com hidrocarbonetos e se manter acima de 50% ( $E_{24}$ ) em 24 h de análise, visto que  $E_{24}$  foi maior do que 50 %, na maioria das fontes hidrofóbicas avaliadas. O melhor resultado obtido foi utilizando óleo de motor (77,9%), ao passo que hexano (61,7%), hexadecano (64,5%) e querosene (61,9%) obtiveram  $E_{24}$  muito próximos (FRANÇA, 2013), ao observar os resultados, se tem que o bioproduto foi mais eficiente ao ser utilizado e testado com fontes hidrofóbicas de maiores viscosidades.

#### **5.2.4 Produção de biosurfactante em reator airlift**

A fim de otimizar o processo de produção de biosurfactante por rota fermentativa, foram realizados ensaios em reator tipo airlift, que possui agitação pelo movimento de ar, assim, não há cisalhamento de células e moléculas pelas pás do agitador mecânico de um reator tipo tanque agitado. A Figura 16 ilustra a tensão superficial do caldo fermentado livre de células contendo o biosurfactante produzido pela cepa ICA 56 em reator airlift com 2,0 vvm de aeração e pH não controlado.

Figura 16 – Medida da tensão superficial do caldo fermentado livre de células contendo o biosurfactante produzido pela cepa ICA 56 em reator airlift com 2,0 vvm de aeração e pH não controlado.

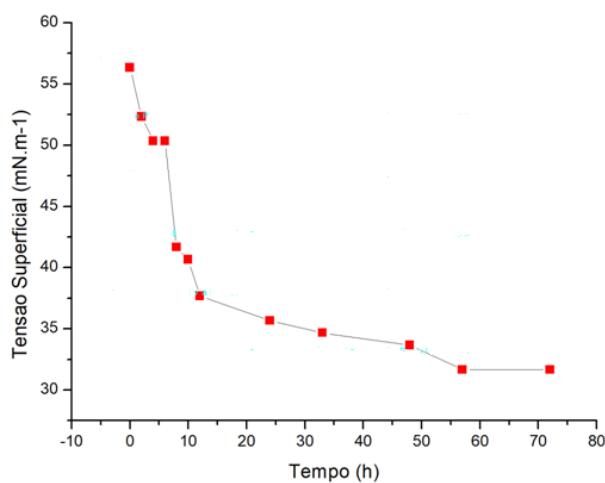


Fonte: elaborada pela autora.

Observa-se que a tensão superficial permaneceu com um valor alto até 33 h de fermentação, aproximadamente, tendo seu menor valor ( $31 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) em 48 h de processo, o pH final do caldo fermentado foi 5,98.

A Figura 17 mostra o comportamento da tensão superficial da solução rica em biossurfactante bruto ao controlar o pH em 7,0 com HCl 1M e NaOH 1M na mesma aeração do ensaio anterior, 2,0 vvm.

Figura 17 - Comportamento da tensão superficial do caldo fermentado livre de células contendo o biossurfactante produzido pela cepa ICA 56 em reator airlift ao controlar o pH em 7,0 e aeração de 2,0 vvm

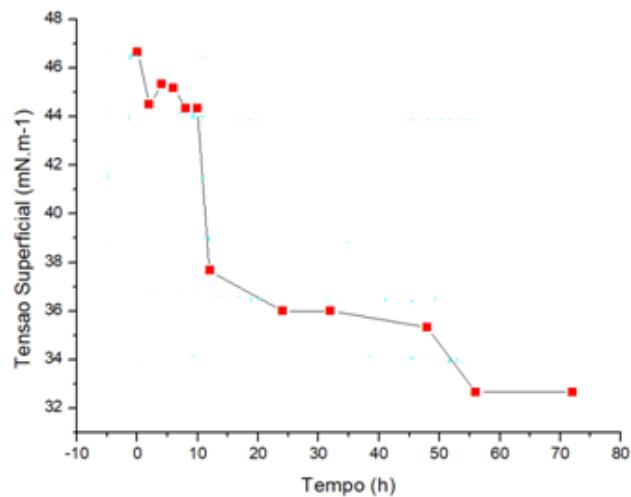


Fonte: elaborada pela autora.

Analizando a Figura 17, observa-se que a tensão superficial atingiu um valor considerado bom em 24 h de fermentação, quando atinge um valor de  $35,7 \text{ mN.m}^{-1}$ , indicando a produção da surfactina (biossurfactante). Esse adiantamento de produção do bioproduto comparando com o processo sem controle de pH pode ser explicado pelo fato de a surfactina precipitar quando o pH do meio estiver ácido. Assim, os ensaios seguintes ocorreram com o controle de pH em  $7,0 \pm 0,2$  com HCl 1M e NaOH 1M.

A Figura 18 expõe os valores de tensão superficial ao aerar o processo com 2,5 vvm.

Figura 18 – Comportamento da tensão superficial com pH controlado e aeração de 2,5 vvm

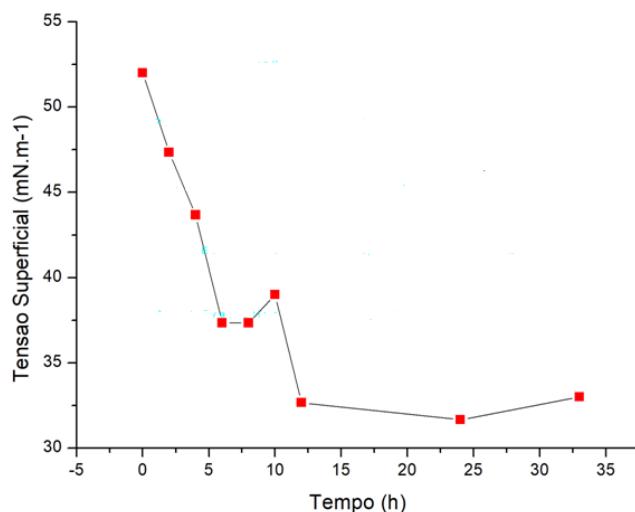


Fonte: elaborada pela autora.

Observa-se na Figura 18 que o bio surfactante apresenta seu menor valor de tensão superficial com 56 h de fermentação, entretanto, em 30 h, aproximadamente, esses valores são considerados bons. O perfil do comportamento da tensão superficial é semelhante ao perfil obtido do processo utilizando 2,0 vvm de aeração.

A Figura 19 indica o perfil de tensão superficial frente a uma aeração de 3,5 vvm.

Figura 19 – Comportamento da tensão superficial do caldo fermentado livre de células contendo o biossurfactante produzido pela cepa ICA 56 em reator airlift no processo com controle de pH e aeração de 3,5 vvm



Fonte: elaborada pela autora.

Observa-se na Figura 19 que em 12 h de fermentação, a tensão superficial do caldo fermentado livre de células já atingiu valores baixos, considerados adequados (BARROS *et al.*, 2008). Isso pode ter ocorrido devido a agitação ser realizada apenas com o movimento do ar, pois sem cisalhamento das células, há mais unidades produtoras, todo o biossurfactante produzido permanece com atividade na solução, e também porque com o aumento da aeração, aumenta também a agitação, resultando em uma mistura mais eficiente e um meio mais homogêneo.

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

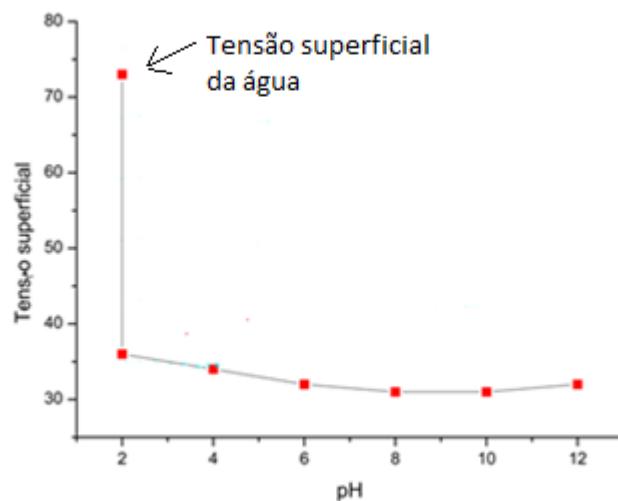
Segundo Vaz *et al.* (2012), os biossurfactantes apresentam propriedades e características que os tornam potenciais insumos em diversos setores e processos industriais. Como normalmente esses processos estão associados a condições extremas (tais como pH, temperatura ou salinidade), se faz necessária uma avaliação da estabilidade desses biossurfactantes frente à essas condições (FRANÇA, 2013).

A estabilidade do biosurfactante produzido frente às variações das condições anteriormente citadas foi avaliada por intermédio da análise da tensão superficial.

#### 5.2.5.1 Efeito do pH

A Figura 20 mostra o efeito da variação do pH na tensão superficial do biosurfactante produzido pela cepa ICA56

Figura 20 – Comportamento da tensão superficial do biosurfactante bruto frente às variações de pH



Fonte: elaborada pela autora.

Analizando a Figura 20, observa-se que o biosurfactante produzido apresentou os menores valores de tensão superficial 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 73 para 31 mN.m<sup>-1</sup>, representando uma redução de aproximadamente 57%. O resultado obtido nesta faixa de pH era esperado, considerando-se as características do biosurfactante produzido, pois em pH's próximos à neutralidade (pH 7,0), a surfactina fica solubilizada em solução, mantendo suas propriedades tensoativas. Apesar de que na faixa mais próxima da neutralidade, em todos os valores de pH

estudados, a tensão superficial permaneceu aproximadamente constante e inferior a  $40 \text{ mN.m}^{-1}$ .

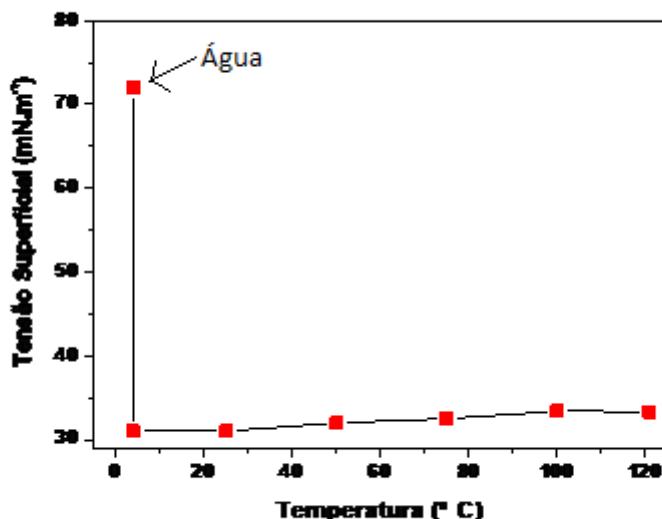
Valores de pH's ácidos propiciam a precipitação da surfactina, causando possível perda desse produto. Devido à presença dos ácidos glutâmico e aspártico (aminoácidos) na estrutura da surfactina, o contato com outro ácido causa a protonação da cadeia lateral destes aminoácidos, tornando a surfactina insolúvel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

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

#### 5.2.5.2 Efeito da temperatura

Com o objetivo de analisar o efeito da temperatura nas propriedades tensoativas do bio surfactante produzido, alíquotas de solução do bio surfactante bruto foram expostas a diferentes temperaturas (4, 25, 50, 75, 100 e 121 °C) por 30 min. A Figura 21 traz o efeito da variação da temperatura na tensão superficial de solução rica em bio surfactante bruto.

Figura 21 – Efeito da variação da temperatura na tensão superficial da solução de bio surfactante bruto



Fonte: elaborada pela autora.

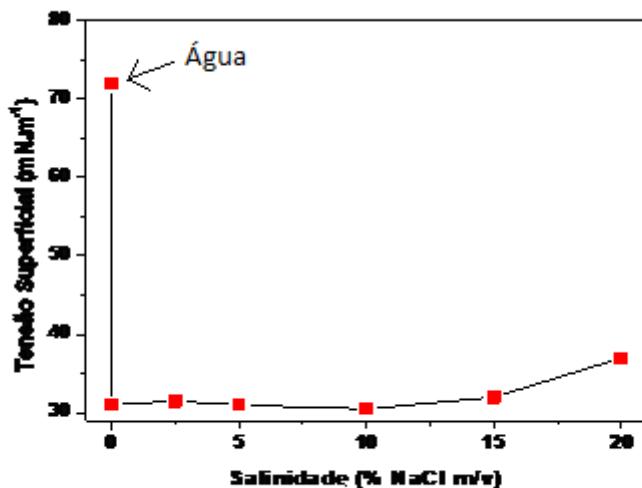
A Figura 21 exibe que mesmo com a variação da temperatura realizada na solução rica em biossurfactante bruto, as propriedades tensoativas não apresentaram mudanças significativas nas temperaturas estudadas.

A tensão superficial da solução de biossurfactante permaneceu na faixa entre 31 e 33 mN.m<sup>-1</sup>, praticamente constante, mostrando assim a estabilidade da atividade superficial do tensoativo produzido frente as variações de temperaturas analisadas.

#### 5.2.5.3 Efeito da força iônica

Foram preparadas soluções de NaCl (de 0 a 20 % m/v) e adicionadas à uma solução rica em biossurfactante a fim de analisar a estabilidade do bioproduto formado em termos de tensão superficial. A Figura 22 apresenta os resultados deste estudo.

Figura 22 – Comportamento da tensão superficial da solução rica em biossurfactante bruto conforme a variação de concentração salina



Fonte: elaborada pela autora.

A tensão superficial não apresentou variação significativa, permanecendo constante na faixa entre 31 e 32 mN.m<sup>-1</sup>, exceto para a concentração de 20 % de NaCl, apresentando uma tensão de 37 mN.m<sup>-1</sup>, ou seja, para esta concentração salina, a eficiência do biossurfactante é reduzida. Mesmo na concentração de NaCl mais elevada (20%), onde a tensão superficial sofreu um aumento, o biossurfactante

produzido ainda foi capaz de reduzir cerca de 48% na tensão superficial. Com a salinidade de até 10%, foi observada uma pequena variação na nas propriedades tensoativas do bioproduto. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl enquanto que concentrações salinas de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

## 6 CONCLUSÃO

A levedura *Aureobasidum pullulans* URM 7053 não é produtora de biossurfactante, mas pode ser usada em processos de produção de bioemulsionante, pois analisando a tensão superficial e o índice de emulsão, foi observado que não houve redução significativa na tensão em nenhum dos dois modelos de reatores utilizados, ao passo que foi observada uma boa capacidade de formar emulsão.

A utilização da aeração e da agitação se mostrou necessária para a produção do bioemulsionante em biorreator de agitação mecânica. Nesse modelo de biorreator a condição de 350 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração obteve o melhor resultado com índice de emulsificação de  $63,29 \pm 1,94\%$ . Verificou-se também que a produção do bioemulsionante no reator airlift foi mais eficiente ao reduzir em 72 h o tempo de fermentação.

A bactéria *Bacillus subtilis* ICA 56 foi capaz de produzir o biossurfactante nos dois modelos de reatores, obtendo o melhor resultado em reator airlift, o que pode ser explicado por não haver o cisalhamento das células.

O biossurfactante se mostrou estável frente às variações de pH, força iônica e temperatura, comprovando sua aplicabilidade nos diversos setores da indústria.

Analizando os resultados obtidos nos ensaios realizados, tem-se que o microrganismo *Bacillus subtilis* ICA 56 é produtor de biossurfactante, com melhores resultados no reator airlif, o bioproduto teve alterações insignificantes em suas propriedades frente a variações de pH, força iônica e temperatura, ou seja, apresentou estabilidade, assim, este pode ser utilizado nas diversas áreas de aplicação.

## REFERÊNCIAS

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**, v.81, p.141–146, 2013.

AMARAL P. F; COELHO M. A.; MARRUCHO I. M.; COUTINHO J. A. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 672, p. 236–249, 2010.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Campos Araras, 2004.

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**, v. 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.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Potential commercial applications of microbial surfactants.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p. 495, 2000.

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

BEZERRA, M. S., **Estudo da produção de bio surfactantes 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.

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.; 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.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações.** 2011.

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

ESMERALDO, F.S. **Influência da temperatura na produção de surfactina por *BacillusSubtilis LAMI005***; Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, 2010.

FÁBIO, F. C. B.; PEREIRA, C. Q.; ROBERTO, M. M. J.; MARIA, G. P. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

FELIPE, L.O.; DIAS, S.C. **Surfactantes sintéticos e biosurfactantes: vantagens e desvantagens.** 2017.

FRANÇA, I.W.L. **Estudo da produção e aplicabilidade de biosurfactante bacteriano produzido por cepa isolada de manguezal cearense.** Centro de tecnologia, Departamento de engenharia química – UFC, 2013.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarifiedcashewapplejuice as alternativeraw material for biosurfactantproductionby*Bacillussubtilis* in a batch bioreactor. *BiotechnologyJournal*, v. 4, p. 738–747, 2009.

GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.B.; COSTA, R.; EVTUGUIN, D.V.; COUTINHO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Novel bioemulsifierproducedby a Paenibacillusstrainisolatedfromcrudeoil. *Microb. Cell. Fact.*, v. 14, n. 14, 2015.

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, p. 298-304, 2010.

LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyceslipolytica*.** Campinas, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1996.

LIU, X.; REN, B.; CHEN, M. et al. Production and characterization of a group ofbioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, p. 1881-1893, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Artmed. p. 1091, 2010.

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.

MULLIGAN, C. N. Enviromentalaplications for biosurfactants. *Environ. Pollution*, v. 133, p. 183-198, 2005.

NAJAFPOUR, G.D. **Capítulo 6 – Bioreactor design.** Biochemical Engineering and Biotechnology. Amsterdã, p. 142-169, 2007.

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.

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.

PAL M. P.; VAIDYA B. K.; DESAI K. M.; JOSHI R. M.; NENE S. N.; KULKARNI B. D. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 747–756, 2009.

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.

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.

RAMOS, V.S. **Projeto, Montagem e Instrumentação de um Reator “Airlift” para “Stripping” de Etanol.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas – São Paulo – 2014.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. **Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation** - Life of Science, Dr.RolandoChamy (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. R.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural Cashewapplejuice as fermentationmedium for biosurfactantproductionby *Acinetobacter calcoaceticus*. **Wor. J. Microb. and Biotech.**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L. MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109–116, 2006.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p.154-162, 1999.

SAHARAN B.S.; SAHU R. K.; SHARMA D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. **GeneticEngineeringandBiotechnologyJournal**, v. 21, p.1-14, 2011.

SANTOS, A.P.P.; SILVA, M.D.S.; COSTA, E.V.L. Biosurfactantes: Uma alternativa para o mercado industrial. **FRONTEIRAS Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v.5 n.1, 2016

SANTOS NETO, A. L. C.; VASCONCELLOS, A. M. H.; VALLE, A. B. F.; OLIVEIRA, M. L. C. **Cursos práticos em bioquímica**. Instituto de Química-UFRJ. 6a ed. 1996.

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

SOARES, D.W.F.; **Produção e caracterização de biosurfactante obtido por linhagens de *Bacillusspp.* isoladas de estação de tratamento de águas residuais e solos de manguezais** (Ceará - Brasil), Departamento de engenharia química, Universidade Federal do Ceará, 2014.

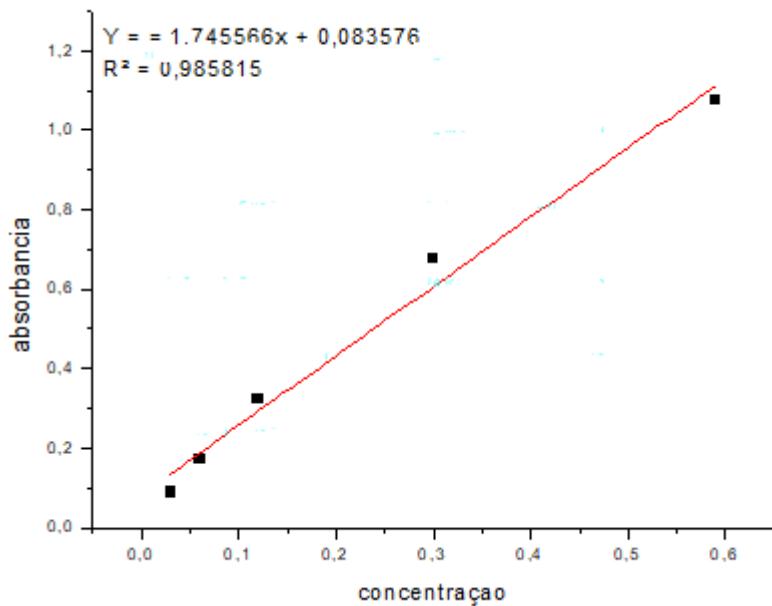
SOUSA, M.; MELO V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H.B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant - producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 897-902, 2012.

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.

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.

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

ZIMMERMAN, W.B.; HEWAKANDAMBY, B.N.; TESAR, V.; BANDULASENA, H.C.H.; OMOTOWA, O.A. On the design and simulation of an airlift loop bioreactor with microbubble generation by fluidic oscilation. **FoodandBioproductsProcessing.**, v. 87, p. 215-227, 2009.

**ANEXO A – CURVA PADRÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DO MICRORGANISMO *Aureobasidium pullulans* URM 7053**

**ANEXOB – CURVA PADRÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DO MICRORGANISMO *Bacillus subtilis* ICA 56**

