



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Programa Oficial de Doctorado en Química



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química

TESE DE DOUTORADO
TESIS DOCTORAL

Título da Tese em Português:

“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES OBTIDOS POR LINHAGENS de *Bacillus sp.* ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS E DE SOLO DE MANGUEZAIS (CEARÁ - BRASIL)”

Título de la tesis en español:

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES OBTENIDOS POR LINAJES DE *Bacillus sp.* AISLADAS DE ESTACIONES DEL TRATAMIENTO DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y DEL SUELO DE MANGLAR (CEARÁ - BRASIL).

Realizada por

DARLANE WELLEN FREITAS SOARES

Dirigida por

Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Universidade Federal do Ceará, Brasil)

Dra. Deisi Altmajer Vaz (Universidad de Granada, España)

DARLANE WELLEN FREITAS SOARES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES OBTIDOS POR
LINHAGENS de *Bacillus sp.* ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
ÁGUAS RESIDUAIS E DE SOLO DE MANGUEZAIS (CEARÁ - BRASIL)**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR – Espanha) para obtenção do Grau de Doutor em Química.
Área de concentração: Processos biotecnológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (UFC - Brasil)

Co-Orientadora: Profa. Dra. Deisi Altmajer Vaz (Universidade de Granada – UGR - Espanha)

FORTALEZA – CE

2014

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

S652p

Soares, Darlane Wellen Freitas.

Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil) / Darlane Wellen Freitas Soares. – 2014.

200 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientação: Profa. Dra. Deisi Altmajer Vaz.

1. Engenharia Química. 2. Surfactina. 3. Biodegradabilidade. 4. Toxicidade I. Título.

CDD 660

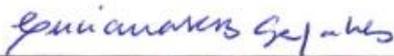
DARLANE WELLEN FREITAS SOARES

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES OBTIDOS POR
LINHAGENS de *Bacillus sp.* ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
ÁGUAS RESIDUAIS E DE SOLO DE MANGUEZAIS (CEARÁ - BRASIL)

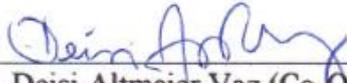
Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR – Espanha) para obtenção do Grau de Doutor em Química. Área de concentração: Processos biotecnológicos.

Aprovada em 27/08/2014.

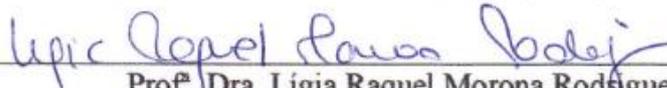
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a. Dra. Deisi Altmajer Vaz (Co-Orientadora)
Universidad de Granada (UGR)



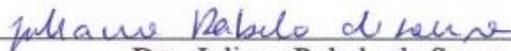
Prof.^a. Dra. Ligia Raquel Morona Rodrigues
Universidade do Minho (UM)



Prof.^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)



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



Dra. Juliana Rabelo de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Ao meu marido Carlos, meu filho Carlos
Diogo, meus pais, Dalva e Joaquim e meus
irmãos Darlan e Dayanne.*

AGRADECIMENTOS

A lista de agradecimentos para mais essa conquista na minha vida é grande, porém não posso deixar de citar pessoas que contribuíram direta ou indiretamente nessa etapa tão importante.

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem fé acredito que não chegamos a lugar nenhum. Somente a fé em Deus me fez suportar as inúmeras adversidades que encontrei ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Dalva e Joaquim, pelo dom da vida, pela educação que me foi concedida, pelo amor e admiração imensuráveis e aos meus irmãos Darlan e Dayanne, por nossa amizade, companheirismo, por rirmos e chorarmos juntos. À minha cunhada Gleylce, pessoa muito especial que me deu de presente um sobrinho lindo, o Enzo.

Ao meu marido Carlos e meu filho Carlos Diogo, por suportarem repetidas vezes minha ausência, meu mau humor, a falta de tempo para eles e mesmo assim, continuarem me amando, me apoiando e me dando muitas alegrias. Meu filho Diogo é a força que me move, o motivo que me faz enfrentar todas as dificuldades e buscar forças onde já não há mais.

Ao meu sogro Sr. Dedé e minha sogra Ana Maria, pelo carinho.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Luciana Gonçalves, pela pessoa brilhante que é, por me tranquilizar com seu otimismo, por transmitir seus conhecimentos e por todas as oportunidades que me deu. Meu eterno carinho, admiração e gratidão.

À Profa. Vânia Melo, por sua atenção, orientação e simpatia em todos os momentos e pelos micro-organismos cedidos. Agradeço também a todos de seu laboratório, em especial, Luína pela ajuda com as cepas e à Denise Hissa, por sua gentil contribuição na interpretação de algumas análises.

À Universidade de Granada (UGR - Espanha) e a todos os professores do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR), destacando Profa. Encarnación Jurado, Profa. Deisi Vaz e Prof. Miguel Román por me receberem e acolherem tão bem e por me propiciarem adquirir novos conhecimentos. Em especial à Profa. Deisi por todo apoio concedido, orientação, simpatia e simplicidade durante os 11 meses que trabalhamos e convivemos juntas e por todo o suporte dado na escrita da Tese. Obrigada é pouco por tudo que ela fez.

Aos amigos que fiz na Universidade de Granada - Espanha, Raúl pro sua companhia super agradável cheia de muita alegria, Rocio por me acolher logo que cheguei não

me deixando ir comer sozinha, por suas conversas super engraçadas e sua alegria, Fran por sua simpatia e prestatividade, Otília que iluminava o laboratório com sua elegância e pelas conversas nos momentos de descontração, Alejandro Burgos por sua ajuda com seus conhecimentos científicos, Pedro pela companhia, alegria e por se preocupar comigo quando ficava doente, José Luís (*in memoriam*), Paco Pacarros, e claro, Ignácio Moya, meu mais que companheiro de pesquisa que mais parecia um menino, por suas brincadeiras, por sua ajuda, sua amizade, por me dar um rolo gigante de papel para enxugar minhas lágrimas nos momentos de desespero e logo me fazer rir chorando, por me fazer voltar a acreditar na humanidade. A Laura, esposa de Ignácio, por me acolher e por exalar tanta serenidade. A Danielle Maass, que conheci na UGR e chegou no meu momento mais difícil na Espanha, tornando-se mais que uma companheira, mas uma amiga irmã. Obrigada por toda a ajuda, pelo carinho, amizade, por rirmos e chorarmos juntas, por conhecermos um pouquinho desse mundão em grande estilo, como mochileiras.

À Vanessa, amiga venezuelana, pelos bons momentos juntas e Alícia, minha verdadeira companheira de piso na Espanha, por ser tão carinhosa e divertida.

Rosana e Cleiton, companheiros do doutorado sanduíche, em cidades vizinhas, pela alegria compartilhada em muitas viagens e pelo companheirismo durante os 11 meses que estivemos vivendo perto, superando nossos limites e ultrapassando barreiras. Rosana que antes era apenas conhecida e tornou-se uma amiga muito querida, por sua alegria, sensibilidade, companheirismo e exemplo de organização. Diana e Ítalo, não só companheiros de pesquisa no Grupo GPBio, mas amigos de verdade. Meu muito obrigada pela nossa parceria e amizade.

Aos companheiros de trabalho do Grupo GPBio, em especial à Juliana Rabelo, por me ajudar com seu rico conhecimento.

Aos amigos que não são da vida acadêmica, Valesca, João Carlos, Amália, Carolina, Ana Mírian, Walésia, Tereza, Paulo de Tarso, Sandro, Goretti, Deusinete, Amélia e Fernanda pelo apoio com palavras de motivação sempre que precisei.

Ao Diogo Bezerra, sempre amigo e companheiro. À Alaídes, amiga, irmã, confidente, por sempre estar ao meu lado para o que der e vier. À Jouciane, uma amiga meiga e companheira, pelas palavras de conforto, por sua presença mesmo à distância, me apoiando, me consolando e não me deixando morar na tristeza.

Aos problemas vividos e superados, com os quais eu aprendi muito.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química (UFC), especialmente o Luís.

Ao Departamento de Engenharia Química (UFC), Universidade Federal do Ceará (UFC) e Universidade de Granada (UGR - Espanha) por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de Doutora.

A CAPES pela bolsa de estudo fomentada e ao CNPq, pela oportunidade de fazer parte do Programa Ciências sem Fronteiras.

*"Escolha o trabalho de que gostas e não terás
de trabalhar um único dia em tua vida."
(Confucio)*

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas de origem microbiana que possuem ação superficial. Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina. Os biossurfactantes apresentam uma série de vantagens quando comparados aos surfactantes químicos convencionais, tais como: diversidade de estruturas químicas, excelentes propriedades superficiais e ecológicas, estabilidade frente a condições extremas (pH, temperatura, concentração de sais), entre outras. Dentro deste contexto, desenvolveu-se o presente trabalho, cujo objetivo principal consistiu em investigar a produção de biossurfactantes, em especial a surfactina, a partir da fermentação submersa utilizando diferentes meios de cultivo (sintéticos e naturais) e diferentes micro-organismos do gênero *Bacillus*, os quais foram isolados de uma estação de tratamento de esgoto (UFC - Pici) e de solo de manguezal. Dentre os meios de cultivo testados, avaliou-se a utilização de meios sintéticos e suco de caju clarificado, um substrato não convencional, proveniente das indústrias do processamento do caju. A escolha do suco de caju clarificado justifica-se pelo fato de que a sua cadeia produtiva gera importantes volumes de co-produtos frequentemente desperdiçados na indústria. Dentre as diferentes linhagens de *Bacillus* testadas para a produção de biossurfactantes, destacou-se a linhagem denominada ICA56, isolada do solo de manguezal de Icapuí (Ceará - Brasil). Testes qualitativos indicaram capacidade de consumo de petróleo e misturas de óleo de girassol e oliva (tanto virgem como usado) pelo micro-organismo *B. subtilis* ICA56. O biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 foi caracterizado quanto as suas propriedades físico-químicas, atividade superficial, capacidade emulsionante e estrutura química. Os valores de tensão superficial ($28,20 \pm 0,07$ mN/m), tensão interfacial ($5,26 \pm 0,08$ mN/m a 25 °C, para uma concentração de 60 mg/L), e concentração micelar crítica ($0,0173 \pm 0,001$ g/L, 25 °C) estão de acordo com os trabalhos publicados por outros pesquisadores. Estabilidade frente a altas temperaturas (121 °C por 60 minutos), ampla faixa de pH (5,0 a 10,0) e concentração de NaCl (10 a 50 g/L) também foram observadas bem como índice de emulsão superior a 50% durante 15 dias de observação. Mediante análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectrometria de Massa (MS), o biossurfactante foi identificado como o lipopeptídeo do tipo surfactina, uma vez que os espectros obtidos para o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 e para a surfactina padrão (Sigma Aldrich) apresentaram perfis semelhantes. Ensaio de remediação de solos contaminados com óleo de motor foram também desenvolvidos com a finalidade de estudar o potencial do biossurfactante em áreas ambientais. O biossurfactante produzido no presente estudo foi capaz de remover 85,01% de óleo lubrificante adsorvido em areia em ensaio realizado a 65 °C utilizando solução de biossurfactante na concentração de 60 mg/L. A literatura relata que os biossurfactantes são menos tóxicos do que os surfactantes sintéticos. Neste trabalho, a toxicidade e biodegradabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 foram avaliadas. Em testes com bioindicadores de toxicidade, o biossurfactante apresentou baixos valores de toxicidade em diferentes organismos aquáticos tais como: a microalga *Selenastrum capricornutum*, o microcrustáceo *Daphnia magna* e a bactéria *Vibrio fischeri*, apresentando valores de EC₅₀ de 65,03 mg/L, 170,09 mg/L e 912,35 mg/L, respectivamente. Adicionalmente, o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 apresentou alta biodegradabilidade, com valores de B50 (50% de biodegradação) por *Pseudomonas putida* correspondente a 122,1 mg/L e utilizando águas de tratamento de esgoto como inóculo ocorreu mais de 50% de degradação de todas as concentrações estudadas (10 a 200 mg/L) em 100 horas de experimento e mais de 90% em 300 horas. Tais resultados evidenciam a compatibilidade ambiental do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56,

ressaltando-se especialmente seu potencial de aplicação na resolução de problemas ambientais.

Palavras-chave: Linhagens de *Bacillus sp.*; produção de biossurfactantes; surfactina; remediação; biodegradabilidade; toxicidade.

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules of microbial origin that have superficial action. Among the most effective are the lipopeptide biosurfactants produced by bacteria of the genus *Bacillus*, especially surfactin. The biosurfactants have a number of advantages compared to conventional chemical surfactants, such as diversity of chemical structures and ecological excellent surface properties, stability in extreme conditions (pH, temperature, salt concentration), among others. In this context, is developed this work, whose main objective was to investigate the production of biosurfactants, surfactin in particular, from the submerged fermentation using different culture media (synthetic and natural) and different micro-organisms of the genus *Bacillus*, which were isolated from a wastewater treatment station (UFC - Pici) and mangrove soil. Among the culture media tested, the use of synthetic media and clarified cashew juice, unconventional substrate from those of the cashew processing industries, were evaluated. The use of cashew apple juice clarification is justified by the fact that its production chain generates significant volumes of co-products in the industry often wasted. Among the different strains of *Bacillus* tested for the production of biosurfactants, stood out the strain ICA56, isolated from soil of mangrove Icapuí (Ceará - Brazil). Qualitative tests indicated consumption capacity of oil and mixtures of sunflower and olive (both virgin and used) by micro-organism ICA56 oil. The interfacial properties, emulsifying capacity and chemical structure of biosurfactant produced by ICA56 were studied. The biosurfactant stability against temperature, pH and NaCl concentration was also evaluated. The values of surface tension (28.20 ± 0.07 mN/m), interfacial tension (5.26 ± 0.08 mN/m to 25 °C at a concentration of 60 mg/L) and critical micelle concentration (0.0173 ± 0.001 g/L, 25 °C) found in this work are in agreement with previous studies by other researchers. The biosurfactant produced by ICA56 was identified as a lipopeptide type, by Spectroscopy Mass (MS) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), since the spectra obtained showed similar profiles of those of a surfactin standard (Sigma Aldrich). Remediation assays of a soil contaminated with engine oil have also been performed in order to study the potential of biosurfactant for environmental applications. The biosurfactant produced by ICA 56 was able to remove 85.01% of lubricant oil adsorbed in tests performed at 65 °C with a biosurfactant concentration of 60 mg/L. The literature reports that biosurfactants are less toxic than synthetic surfactants. The environmental compatibility of the biosurfactant produced by *Bacillus sp.* ICA 56 was evaluated by toxicity and biodegradability tests. The biosurfactant presented low toxicity to aquatic organisms such as the microalgae *Selenastrum capricornutum*, the microcrustacean *Daphnia magna* and the bacterium *Vibrio fischeri*, with EC₅₀ values of 65.03 mg/L, 170.09 g/L and 912.35 mg/L, respectively. Additionally, the biosurfactant produced by ICA56 showed high biodegradability as indicated by the results of biodegradability tests carried out with *Pseudomonas putida* (B50 value, i.e. 50% degradation, at 122.1 mg/L) and with an inoculum from a wastewater treatment plant (more than 50% biodegradation for all the biosurfactant concentrations studied occur within 100 hours and more than 90% within 300 hours). These results demonstrate the high environmental compatibility of the biosurfactant produced by ICA56, which makes it a potential candidate for the remediation of polluted soils.

Keywords: Strains of *Bacillus sp.*; production of biosurfactants; surfactin; remediation; biodegradation; toxicity.

RESUMEN

Los biosurfactantes son sustancias de origen microbiano que poseen actividad superficial. Un grupo de biosurfactantes especialmente eficaces son los lipopéptidos, entre los que destaca la surfactina, que son producidos por bacterias del género *Bacillus* mediante la transformación de sustratos renovables. Dichos tensioactivos presentan un gran número de ventajas cuando se los compara con los tensioactivos sintéticos tradicionales.

En el presente estudio se investigó la producción de biosurfactantes, y en particular la de surfactina, mediante procesos fermentativos con diferentes cepas de *Bacillus*. Para ello se utilizaron medios de cultivo de diferente procedencia (naturales y sintéticos), habiéndose dado especial atención al empleo de fuentes de carbono residuales, como son los residuos del procesamiento del anacardo, y en concreto de la producción de zumo del fruto del anacardo clarificado (“cajuína”). El uso de fuentes de carbono no convencionales se justifica debido a la necesidad de reducir los costos de producción de los biosurfactantes, ya que en la actualidad la producción a gran escala de biosurfactantes resulta todavía poco atractiva económicamente. Por otra parte, el uso de subproductos de la industria del anacardo resulta una alternativa muy interesante, ya que en Brasil, y concretamente en el estado de Ceará, se generan elevados volúmenes de estos subproductos. Además los biosurfactantes producidos fueron posteriormente estudiados desde el punto de vista estructural y de sus propiedades interfaciales.

Tal y como se ha indicado, en las fermentaciones se emplearon diferentes cepas de *Bacillus* (todas ellas aisladas en Brasil), de las cuales se destaca la cepa denominada ICA56, aislada de suelo de manglar (Manglar de Icapuí, Brasil). Desde este punto de vista el trabajo se desarrolló en dos etapas:

1. Etapa 1. Se estudió la producción y caracterización de biosurfactantes mediante diferentes cepas (*B. subtilis* LAMI005, Jag 248, Jag 249, ICA 24, ICA 56) y medios de cultivo.
2. Etapa 2. En ella se desarrollaron estudios exhaustivos con la cepa denominada ICA56, en los que el biosurfactante producido ha sido caracterizado en cuanto a sus propiedades interfaciales (tensión superficial, tensión interfacial, concentración micelar crítica o CMC, y ángulo de contacto), capacidad emulsionante y estructura química. Asimismo, también se estudió la compatibilidad ambiental del producto mediante ensayos de biodegradabilidad y toxicidad. Finalmente se desarrollaron ensayos de remediación de suelos contaminados con aceite lubricante con la finalidad de evaluar el potencial de uso del biosurfactante en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Cómo principales resultados de la Etapa 1, se destaca que, en las condiciones experimentales adoptadas, el microorganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 fue capaz de producir biosurfactante, llegando a alcanzar valores de concentración de 225 mg/L (pH 6.0) y 275 mg /L (pH 7.0) en el medio de cultivo (Anexo A). Bajo todas las condiciones estudiadas, la producción de biosurfactante vino acompañada de una reducción de la tensión superficial del medio líquido hasta valores de $28,3 \pm 0,3$ mN/m. Además, el microorganismo demostró poseer capacidad para emulsionar diversos hidrocarburos (aceite de soja, queroseno y n-hexadecano) con un valor de índice de emulsificación (IE24) superior al 60%. Los análisis estructurales realizados, en concreto los espectros vibracionales obtenidos en la región del

infrarrojo (FTIR), confirman que el biosurfactante producido pertenece a la clase de los lipopéptidos. Por otra parte, también se verificó que el microorganismo denominado *Bacillus sp.* Jag248 presenta una clara producción de surfactina, alcanzando valores de concentración de hasta 161.41 ± 0.01 mg/L en medio mineral; dicha producción fue acompañada de una reducción de la tensión superficial hasta los 28.50 mN/m. El biosurfactante producido fue capaz de emulsionar aceite de soja, n-hexadecano y queroseno, presentando valores de IE24 de 50%. En lo que se refiere al *Bacillus sp.* Jag249, se ha verificado que, en las condiciones experimentales adoptadas, no fue capaz de producir biosurfactantes. En cuanto a las cepas ICA12, ICA24 e ICA56, se llegó a la conclusión de que las mismas son capaces de producir biosurfactantes, y por lo tanto, reducir significativamente la tensión superficial de los medios de cultivo (valores finales de aproximadamente 28.25 ± 0.4 mN/m). Entre las cepas estudiadas, la que permitió alcanzar una mayor concentración de biosurfactante en un medio mineral adicionado de solución de micronutrientes e inóculo *LB Broth* fue la ICA56 (329.14 ± 0.00 mg/L) seguida de la ICA24 (111.87 ± 0.00 mg/L, medio adicionado con sumo de anacardo clarificado).

Las propiedades interfaciales determinadas en la etapa 2, tensión superficial (28.20 ± 0.07 mN/m), tensión interfacial (5.26 ± 0.08 mN/m a 65 °C, para una concentración de 60 mg/L), y CMC, están de acuerdo con la literatura. Adicionalmente, se verificó que los valores de tensión superficial y tensión interfacial disminuyen con el aumento de temperatura (intervalo 25 – 65°C). Mediante análisis de Espectroscopía Infrarroja (FTIR) y Espectrometría de Masas (MS) se identificó al biosurfactante producido por ICA56 como surfactina. Se investigó también la producción simultánea de biosurfactantes y enzimas por el microorganismo ICA56, constatándose la presencia de amilasas y proteasas en el medio de fermentación al final del proceso. En lo que se refiere a los ensayos de toxicidad, el biosurfactante presentó una baja toxicidad para diferentes organismos, cómo son las microalgas (*Selenastrum capricornutum*), microcrustáceos (*Daphnia magna*) y la bacteria *Vibrio fischeri*, presentando valores de EC50 de 65.03 mg/L, 170.09 mg/Ly 912.35 mg/L, respectivamente. El biosurfactante producido por ICA56 presentó también una alta biodegradabilidad, siendo degradado tanto por bacterias presentes en aguas residuales urbanas (población mixta y aireada) cómo por *Pseudomonas putida*.

Por último los ensayos de lavado de suelos contaminados con aceites lubricantes permitieron estudiar el efecto de la temperatura y de la concentración del biosurfactante producido por ICA56 sobre la eficacia de lavado. Mediante técnicas estadísticas, se comprobó la significancia de ambos parámetros. Los mejores resultados de lavado (85% de eficacia) se obtuvieron a 65 °C, para una concentración de biosurfactante de 60 mg/L. En ensayos cualitativos también se verificó que el microorganismo ICA56 es capaz de degradar de forma eficiente petróleo y mezclas de aceite de girasol e oliva (tanto virgen como usado), lo que sugiere la posibilidad de su uso para fines de biorremediación.

Palabras clave: *Bacillus sp.*; producción de biosurfactantes; surfactina, remediación de suelos, biodegradabilidad; toxicidad

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1. Biossurfactantes: características, propriedades e aplicações	31
3.2. <i>Bacillus subtilis</i> e a produção de biossurfactantes.....	39
3.2.1. Linhagens de <i>Bacillus sp.</i> produtoras de biossurfactantes isoladas de diversos ambientes.....	43
3.3. Metodologias utilizadas para caracterização de biossurfactantes	44
3.4. Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos e biotensoativos	46
3.4.1. Toxicidade de tensoativos e biotensoativos à organismos aquáticos.....	46
3.4.2. Biodegradabilidade de tensoativos e biotensoativos	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. Processamento do pedúnculo de caju para obtenção do suco de caju clarificado utilizado como fonte de carbono e energia para produção de biossurfactantes.....	53
4.2. Micro-organismos	53
4.3. Inóculo	54
4.4. Meios de cultivo e produção em agitador rotatório de bancada	56
4.5. Métodos Analíticos	57
4.5.1. Concentração de Biomassa: Curva de calibração e acompanhamento do crescimento celular.....	57
4.5.2. Determinação da Concentração de Substrato.....	57
4.5.3. Determinação da concentração de surfactina	58
4.6. Extração de biossurfactantes.....	58
4.7. Caracterização físico-química.....	59
4.7.1. Determinação da tensão superficial do biossurfactante produzido por linhagens de <i>Bacillus sp.</i> LAMI005, Jag 248, Jag 249, ICA 24 e ICA 56.....	59
4.7.2. Determinação do Índice de Emulsificação.....	60
4.8. Caracterização estrutural do lipopeptídeo produzido por linhagens de <i>Bacillus sp.</i>	60
4.8.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI 005 e <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56....	60

4.8.2. Espectrometria de Massa do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56	61
4.9. Estimativa de parâmetros para avaliação da produção de biossurfactantes pelas linhagens de <i>Bacillus sp.</i> estudadas	62
4.10. <i>Bacillus subtilis</i> ICA56: Inibição do crescimento do micro-organismo produtor de biossurfactantes em placas contendo diferentes contaminantes	63
4.11. Degradação de contaminantes em placa por <i>Bacillus subtilis</i> ICA56	63
4.12. Biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56: características, propriedades e aplicações.....	64
4.12.1. Determinação da Tensão Superficial e da Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56.....	64
4.12.2. Tensão Interfacial e Ângulo de Contato de soluções aquosas do biossurfactante produzido por ICA 56	65
4.12.3. Estabilidade de emulsão formada utilizando solução de biossurfactante e dodecano.....	65
4.12.4. Estabilidade do biossurfactante produzido frente à temperatura, pH e Força Iônica	66
4.12.5. Avaliação do poder de remoção (%) de óleo lubrificante adsorvido em areia utilizando o biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56.....	67
4.13. Ensaio de Biodegradabilidade do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56.....	70
4.13.1. Ensaio de biodegradabilidade utilizando <i>Pseudomonas putida</i>	71
4.13.2. Ensaio de biodegradabilidade utilizando o Método Estático	72
4.14. Toxicidade em organismos aquáticos	74
4.14.1. Toxicidade do biossurfactante em microalga (<i>Selenastrum Capricornutum</i>).....	75
4.14.2. Toxicidade do biossurfactante ao microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	76
4.14.3. Toxicidade do biossurfactante em bactérias marinhas luminescentes <i>Vibrio fischeri</i> NRRL-B-11177	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
5.1. Seleção de micro-organismos para a produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos	81
5.1.1. Seleção de cepas e avaliação de meios de cultivo.....	81
5.2. Aplicação do micro-organismo ICA 56 em testes de degradação de contaminantes em areia.....	91
5.2.1. Inibição do crescimento de <i>B. subtilis</i> ICA56 por diferentes contaminantes.....	91
5.2.2. Degradação em placa	93
5.3. Caracterização estrutural do biossurfactante	95

5.3.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para <i>Bacillus sp.</i> LAMI005 e ICA 56	95
5.3.2. Espectrometria de Massa.....	97
5.4. Caracterização físico-química do biossurfactante produzido por ICA 56	101
5.4.1. Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)	101
5.4.2. Ângulo de Contato (AC) e Tensão Interfacial (TI)	103
5.5. Estabilidade do biossurfactante produzido por ICA 56	105
5.5.1. Índice de Emulsificação (IE ₂₄) e estabilidade de emulsões.....	105
5.5.2. Estabilidade do biossurfactante produzido frente à temperatura, pH e força iônica	108
5.6. Aplicação do biossurfactante produzido por ICA 56 para remoção de óleo lubrificante adsorvido em areia	113
5.7. Ensaio de Biodegradabilidade	117
5.7.1. Biodegradabilidade do biossurfactante produzido por ICA 56 por <i>Pseudomonas putida</i>	118
5.7.2. Biodegradabilidade do biossurfactante por bactérias presentes em água de estação de tratamento de esgoto: Método Estático	120
5.8. Toxicidade do biossurfactante produzido por ICA 56 em organismos aquáticos	124
5.8.1. Toxicidade do biossurfactante em microalga (<i>Selenastrum Capricornutum</i>).....	124
5.8.2. Toxicidade do biossurfactante ao microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	127
5.8.3. Toxicidade do biossurfactante em bactéria marinha luminescente <i>Vibrio fischeri</i> NRRL-B-11177	128
6. CONCLUSÕES	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
ANEXO A	161
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DO PRESENTE ESTUDO	161

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo da acumulação de biosurfactantes na interface entre líquido e ar. (Fonte: PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). 36
- Figura 2** - Relação entre concentração de biosurfactante, tensão superficial e formação de micelas. (Fonte: WHANG et al., 2008). 36
- Figura 3** - Esquema do dispositivo experimental utilizado para os ensaios de remediação. Fonte: Moya-Ramírez et al., (2014). 68
- Figura 4** - Resultados obtidos para os ensaios realizados em meio mineral suplementado com solução de micronutrientes, por 72 h, 150 rpm, 30 °C. (▼) Tensão superficial, (●) Consumo de glicose e (■) Concentração de Biomassa. (A) *Bacillus sp.* Jag 248, (B) Jag 249, (C) ICA 24 e (D) ICA56. 83
- Figura 5** - Resultados obtidos de concentração de surfactina nos ensaios realizados em meio mineral suplementado com solução de micronutrientes, por 72 h, 150 rpm, 30 °C. (■) *Bacillus sp.* Jag 248, (●) ICA 24 e (▲) ICA 56. 84
- Figura 6** - Resultados obtidos de produtividade dos biosurfactantes produzidos nos ensaios realizados em meio mineral suplementado com solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono, por 72 h, 150 rpm, 30 °C; (■) *Bacillus sp.* Jag 248, (●) ICA 24 e (▲) ICA 56. 88
- Figura 7** - Placas APGE (ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) inoculadas com *B. subtilis* ICA56 na presença de diferentes contaminantes ambientais no início do teste; (1 – Óleo lubrificante usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha). 92
- Figura 8** - Placas APGE (ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) inoculadas com *B. subtilis* ICA56 na presença de diferentes contaminantes ambientais após 48 horas de incubação a 30 °C (1 – Óleo lubrificante usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha). 92
- Figura 9** - Degradação em placas de areia contaminada com diferentes concentrações de petróleo por inóculo de *B. subtilis* ICA56. 93
- Figura 10** - Degradação em placas de areia contaminada com Óleo lubrificante usado, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80:20) virgem e Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80:20) usado por inóculo de *B. subtilis* ICA56. 94

Figura 11 - FTIR - espectrograma vibracional na região do infravermelho para surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina semi purificada excretada por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 cultivada em suco de caju clarificado (CAJC) + sulfato de amônio (1,0 g.L ⁻¹) em ≈ 60 g.L ⁻¹ de ART, 30 °C e 180 rpm.	96
Figura 12 - FTIR - Espectrogramas vibracionais na região do infravermelho para surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina dialisada e liofilizada, excretada por <i>B. subtilis</i> . ICA56 cultivada em meio mineral, a 30 °C, 150 rpm, 48 horas.....	96
Figura 13 - Cromatogramas em HPLC para (A) Surfactina Padrão (Sigma Aldrich); (B) Biossurfactante bruto liofilizado produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56.	98
Figura 14 - Espectrogramas de massa para: (A) Surfactina Padrão (Sigma Aldrich); (B) Biossurfactante dialisado e liofilizado produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56.	100
Figura 15 - Valores de tensão interfacial (TI) obtidos a diferentes temperaturas e concentrações de biossurfactante bruto liofilizado produzido por <i>B. subtilis</i> ICA 56.....	105
Figura 16 - Resultados obtidos para índice de emulsificação (IE%) de amostras preparadas em vortex mantidas a 25 °C por 14 dias utilizando diferentes concentrações do biossurfactante bruto liofilizado produzido por <i>B. subtilis</i> ICA 56.....	107
Figura 17 - Estabilidade do biossurfactante produzido por <i>B.subtilis</i> ICA56 a diferentes temperaturas e intervalos de tempo (25, 45, 65 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72h).	108
Figura 18 - Estabilidade do biossurfactante frente a variação de pH (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0) a temperatura de 45 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72 horas.....	110
Figura 19 - Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes concentrações de sal e temperatura de 45 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72 horas (10, 20, 30, 40 e 50 g/L de NaCl).	112
Figura 20 - Gráfico de contorno que relaciona eficiência de remoção com os fatores estudados: temperatura e concentração de biossurfactante.	115
Figura 21 - Eficiência da biodegradabilidade do biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 realizados com <i>P. putida</i>	119
Figura 22 - Carbono Orgânico Dissolvido Residual (COD) para teste de biodegradação do biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 para diferentes concentrações testadas utilizando como inóculo uma população aerada e mixta.....	121
Figura 23 - Biodegradação final (%) do biossurfactante produzido por ICA56 para diferentes concentrações testadas utilizando como inóculo uma população aerada e mixta.	121

Figura 24 - Linearização entre a % de inibição e Log da concentração de biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 testada para avaliação da toxicidade em microalgas do tipo <i>Selenastrum capricornutum</i>	125
Figura 25 - Linearização entre a % de Inibição e Log da concentração de Saponina (Sigma Aldrich) testada para avaliação da toxicidade em microalga do tipo <i>Selenastrum capricornutum</i>	126
Figura 26 - Representação gráfica de Log de Gama versus Log da concentração de biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 testado com o micro-organismo luminescente <i>Vibrio fischeri</i> NRRL-B-11177: (A) 15 minutos e, (B) 30 minutos de exposição.....	129
Figura 27 - Representação gráfica de Log de Gama versus Log da concentração de saponina testado com o micro-organismo luminescente <i>Vibrio fischeri</i> NRRL-B-11177: (A) 15 minutos e, (B) 30 minutos de exposição.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e os microrganismos produtores.	32
Tabela 2 - Funções dos biossurfactantes e suas aplicações.	38
Tabela 3 - Cepas de <i>Bacillus</i> utilizadas nesse trabalho e sua identificação com base na análise do gene rRNA 16S com o programa BLAST (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool (Altschul <i>et al.</i> , 1997)).	54
Tabela 4 - Composição do meio mineral (MM).	55
Tabela 5 – Composição da solução concentrada de micronutrientes.	55
Tabela 6 - Variáveis estudadas nos ensaios de estabilidade do biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56.	66
Tabela 7 – Condições experimentais empregadas nos testes de remediação.	69
Tabela 8 - Composição do inoculo, meio de compostos inorgânicos e elementos-traço.	72
Tabela 9 - Composição das soluções A, B, C e D empregadas na preparação dos meios de cultivo para realização dos ensaios de biodegradabilidade.	73
Tabela 10 - Resultados de concentração de surfactina obtidos para ensaios realizados com as cepas <i>B. subtilis</i> LAMI005, <i>Bacillus sp.</i> Jag 248, Jag 249, ICA 24 e <i>B. subtilis</i> ICA 56, por 48 h, 30 °C.	81
Tabela 11 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE24) para o ensaio realizado utilizando <i>Bacillus subtilis</i> Jag248 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono.	86
Tabela 12 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE24) para amostras do ensaio realizado para produção de biossurfactantes por ICA24 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono a 30 °C, 150 rpm, pH inicial 7,0.	87
Tabela 13 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE24) para amostras do ensaio realizado para produção de biossurfactantes por <i>B. subtilis</i> ICA56 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono a 30 °C, 150 rpm, pH inicial 7,0.	87
Tabela 14 - Principais resultados cinéticos da produção de biossurfactante por <i>Bacillus sp.</i> Jag 248, ICA 24 e <i>B. subtilis</i> ICA 56.	90

Tabela 15 - Tensão superficial (TS) do meio de cultivo livre de células no início das fermentações realizadas para produção de biossurfactantes pelo micro-organismo <i>B. subtilis</i> ICA56 e após 48 horas de ensaio.....	101
Tabela 16 - Valores de CMC e Tensão Superficial (TS) obtidos para o biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56. Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).....	102
Tabela 17 - Resultados obtidos para ângulo de contato realizado a 25 °C usando diferentes concentrações de biossurfactante bruto produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56.....	103
Tabela 18 - Índice de Emulsão % (IE_{24}) obtidos após 24 h e 336 h de observação a partir de soluções de biossurfactante bruto produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56.....	106
Tabela 19 - Resultados da avaliação de estabilidade do biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 frente a variação de pH (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0) e temperatura de 45 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72 horas.....	111
Tabela 20 - Eficiência de remoção (ER%) do contaminante (óleo lubrificante) em ensaios de remediação de solo utilizando o biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56.	114
Tabela 21 - Valores dos coeficientes do modelo para o planejamento experimental. O desvio padrão de cada coeficiente, o valor de p correspondente e o seu intervalo de confiança de 95% também são incluídos.	114
Tabela 22 - Parâmetros característicos dos perfis de biodegradabilidade para o biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA 56.....	122
Tabela 23 - Concentrações de biossurfactante (mg/L) produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 utilizadas para ensaios de toxicidade em algas, % inibição encontradas e Log da concentração de BS.....	124
Tabela 24 - Concentrações de saponina (mg/L) utilizadas para ensaios de toxicidade em algas, % inibição encontradas e Log da concentração de saponina.....	125
Tabela 25 - Efeito inibitório (%) do biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56 e da saponina realizados em microcrustáceo da espécie <i>Daphnia magna</i>	127
Tabela 26 - Resultados dos testes de toxicidade aguda realizado com <i>Vibrio fischeri</i>	130

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Grupo de Pesquisas em Processos Biotecnológicos (GPBio) da Universidade Federal do Ceará (UFC) vêm desenvolvendo estudos sobre a produção de biossurfactantes desde o ano de 2004. Diferentes bactérias já foram amplamente utilizadas pelo grupo GPBio para realização de pesquisas sobre a produção de biotensoativos de interesse comercial, como linhagens de *Bacillus*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como o uso de substratos alternativos como suco de caju clarificado (co-produto da indústria de processamento de castanha e pedúnculo de caju) e glicerina (co-produto da produção de biodiesel) (SOUSA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2012; GIRO *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009). O interesse na produção de biossurfactantes deu-se devido a sua ampla gama de aplicações comerciais e suas vantagens em relação aos tensoativos derivados do petróleo. A utilização de resíduos ou co-produtos industriais são uma excelente alternativa para a redução dos custos na produção de biossurfactantes e tem recebido importante atenção nas pesquisas desenvolvidas nessa área. As novas legislações de controle do meio ambiente, a crescente preocupação ambiental entre os consumidores e o aumento na produção mundial desses bioprodutos está levando à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A vasta diversidade de micro-organismos existentes e identificados ao longo da história evolutiva vem contribuindo fortemente com a riqueza e complexidade das interações entre os organismos do solo, incluindo desde simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (BEARE *et al.*, 1995). Com isso, a produção de biossurfactantes por bactérias isoladas do solo, da água do mar, de sedimentos marinhos e de áreas contaminadas por óleos vem sendo frequentemente investigadas (MAIER, 2003; BARROS *et al.*, 2007). Com isso, realizou-se no presente estudo um screening de cepas de *Bacillus* pertencentes a coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana Tecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), isoladas da estação de tratamento de esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e de solos dos manguezais de Jaguaribe e Icapuí.

Os surfactantes ou tensoativos constituem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais. A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são derivados do petróleo (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Surfactantes são compostos formados por moléculas constituídas de uma porção polar e outra apolar. A porção polar, solúvel em água, pode ser iônica, não iônica ou anfotérica, dependendo das condições do pH da solução aquosa na qual estão inseridas. A outra porção, apolar, insolúvel em água e solúvel em lipídios, geralmente é um hidrocarboneto (DESAI & BANAT, 1997).

Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Uma grande vantagem dos surfactantes biológicos sobre aqueles de origem química é a possibilidade de produção utilizando substratos renováveis, especialmente tratando-se dos custos de produção (KOSARIC, 1992). Apresentam grande diferença em relação aos surfactantes sintéticos quanto aos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, além da vantagem de produzirem baixos impactos ambientais em relação aos detergentes químicos convencionais (SHAFI & KHANNA, 1995; BANAT *et al.*, 2000). Dentre as características mais relevantes dos biossurfactantes destacam-se a fácil biodegradabilidade, baixa toxicidade e, conseqüentemente, fácil aceitabilidade ecológica para atuarem como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos de baixa solubilidade em água (DESAI & BANAT, 1997, COOPER *et al.*, 1981; MULLIGAN, 2005; YEH *et al.*, 2006). Tais compostos apresentam ainda a capacidade de atuar em condições drásticas de temperatura, pH ou concentração de sal (COOPER *et al.*, 1981). O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais que incluem emulsificação, separação, umectação, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em diversos campos da agricultura, da construção, de indústrias alimentícias, de bebidas, petróleo, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (BOGNOLO, 1999; FIECHTER, 1992; MULLIGAN *et al.*, 2001). Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (DESAI & BANAT, 1997).

Vale salientar que apesar de todas as características apresentadas pelos surfactantes naturais, o mesmo ainda não é economicamente competitivo, devido ao alto custo de sua produção associado com a utilização de substratos caros e métodos ineficientes de recuperação do produto (FOX & BALA, 2000). A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas anuais, no qual o maior percentual é utilizado como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (BANAT, I. M., 2000). Altos custos de produção de biossurfactantes são incompatíveis com as necessidades das aplicações

industriais, que requerem grandes quantidades. Portanto, é fundamental reduzir os custos de produção. Considerando a importância nutricional do meio de cultivo para obtenção de biotensoativos, o uso de substratos alternativos, ricos em carboidratos e/ou lipídios para crescimento dos micro-organismos e biossíntese dos biossurfactantes, como, por exemplo, aqueles provenientes da agroindústria, são uma alternativa para a redução de custos na obtenção de bioprodutos, propiciando bons rendimentos na produção de biossurfactante (MUKHERJEE *et al.*, 2005; GALLERT, 2002; AKKAR & CAMEOTRA, 2002a; MERCADE *et al.*, 1993).

Avaliando o âmbito regional, mais especificamente da agroindústria do estado do Ceará, o suco de caju apresentou-se como um substrato alternativo a ser estudado. Apesar de haver mercado para o pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) o mesmo não absolve toda a oferta, tornando-se uma matéria-prima de pouco interesse comercial por sua alta pericibilidade. Dentre suas propriedades de interesse para uso como substrato destacam-se a elevada concentração de carboidratos, contendo também lipídios e ferro, substâncias favoráveis para produção de biossurfactantes por micro-organismos (SOUZA FILHO, 1987; WEI & SHU, 1998). O uso do suco de caju clarificado justifica-se pela experiência do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio) com tal matéria-prima. No entanto, ao longo dos experimentos, não se obteve uma propagação dos resultados de concentração obtidos. A medida que variou-se as condições de produção os rendimentos não apresentaram-se satisfatórios para a maioria dos micro-organismos testados. Ao comparar tais resultados obtidos utilizando suco de caju clarificado aos resultados utilizando meio sintético, optou-se pelo meio sintético, descartando o substrato alternativo. Dentre as desvantagens do uso do substrato alternativo, suco de caju clarificado, destaca-se sua sazonalidade, não apresentando uma composição nutricional padrão, havendo sempre variação nas concentrações da composição dos nutrientes. Estas variações na composição do mesmo dificultam a padronização do método de produção e, conseqüentemente afetam os resultados obtidos. No entanto, levando em conta vantagens como a riqueza nutricional do suco e a possibilidade de redução de custos na produção tornam-se interessantes estudos futuros utilizando tal fonte, otimizando a produção e encontrando uma condição satisfatória para obtenção de concentrações relevantes de biossurfactante. Durante o desenvolvimento do presente trabalho, muitos estudos utilizando suco de caju clarificado foram apresentados e publicados antes da realização do screening, onde foram obtidos bons resultados e publicados em revista de

relevância internacional. Os trabalhos desenvolvidos e publicados podem ser vistos no Anexo A.

Sabendo-se que os biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*, geralmente apresentam excelentes propriedades de interesse comercial (BARROS *et al.*, 2007; STELLER & VATER, 2000), em colaboração com o grupo de pesquisa “Engenharia de Interfases e Tecnologia Bioquímica” do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Granada (Espanha), realizaram-se estudos de avaliação da Concentração Micelar Crítica (CMC), Tensão Superficial (TS) e Interfacial (TI), Ângulo de Contato (AC), testes de estabilidade frente a temperatura, pH e força iônica (variando a concentração sal) e avaliação do poder de remoção de contaminantes (%) de solos impregnados com óleo lubrificante. Além disso, testes de toxicidade e biodegradabilidade do biossurfactante produzido foram realizados.

MULLIGAN e colaboradores (1993) afirmam que diferentemente dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente biodegradáveis na água e no solo, tornando-os assim, adequados para aplicações em biorremediação e tratamento de resíduos. Grande atenção também tem sido voltada aos biossurfactantes devido a crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, geralmente a base de petróleo (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998). Surfactantes de origem microbiana apresentam baixa toxicidade, permitindo assim o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ *et al.*, 1998). A baixa toxicidade e alta biodegradabilidade dos biossurfactantes são muito mencionadas na literatura, no entanto, ainda existem poucos estudos que comprovem essas características dos biotensoativos. Diante desses dados e com o intuito de explorar mais esse campo de pesquisa, investigou-se a toxicidade e biodegradabilidade do biossurfactante produzido, a fim de comprovar a seguridade ambiental do bioproduto obtido. Os resultados do presente estudo foram comparados com os reportados na literatura para os tensoativos sintéticos. Realizaram-se dois testes distintos de biodegradabilidade, um utilizando a rizobactéria *Pseudomonas putida* CECT324 e outro mediante emprego de uma população mista e aerada proveniente de uma estação de tratamento de esgoto mediante uso das metodologias aplicadas nas Normas UNE-EN ISO 10712:1996 e UNE 55-844-91, respectivamente, uma vez que os testes foram realizados na Universidade de Granada - Espanha. Para realização dos testes de avaliação da toxicidade, utilizaram-se como bioindicadores três tipos organismos aquáticos típicos: uma alga (*Selenastrum capricornutum*), um microcrustáceo (*Daphnia magna*) e uma bactéria luminescente (*Vibrio*

fischeri). Para tanto, adotou-se o conjunto de Normas: UNE-EN ISO 8692:2012 (ISO 8692:2012), UNE-EN ISO 6341:1996 (UNE EN ISO 6341:1996) e UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2:2007), respectivamente.

Nesse contexto, este trabalho de pesquisa produziu biossurfactantes utilizando diferentes linhagens de *Bacillus* e meios de cultivo, sendo esses sintéticos ou alternativos, como por exemplo, suco caju clarificado, um coproduto agroindustrial, para posterior realização de testes de caracterizações físicas, químicas e estruturais, avaliação do poder de remediação de solos contaminados com óleo lubrificante, estabilidade frente a temperatura, pH e sal, bem como avaliação da biodegradabilidade e toxicidade do bioproduto obtido. A avaliação da eficácia é indicativo de segurança ambiental do biossurfactante produzido neste trabalho. A compatibilidade ambiental do biossurfactante produzido torna-o competitivo com os surfactantes comerciais, despertando o interesse mercadológico e possibilitando o seu uso a nível comercial.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo do processo de produção de biossurfactantes mediante utilização de diferentes linhagens de *Bacillus sp.* e meios nutritivos, tais como suco de caju clarificado e meio sintético. Uma vez selecionada as condições ideais para o processo de produção de biossurfactantes, realizaram-se uma série de medidas com o intuito de caracterizar as propriedades estruturais e físicoquímicas dos biossurfactantes produzidos. Aspectos associados com a compatibilidade ambiental dos agentes de superfície produzidos foram analisados mediante testes de biodegradabilidade e toxicidade. Adicionalmente, avaliou-se o potencial de aplicabilidade do bioproduto na remoção de solos contaminados com óleo lubrificante.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir os objetivos do presente trabalho as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Selecionar a melhor cepa produtora de biossurfactante dentre as seguintes linhagens de *Bacillus sp.*: *Bacillus sp.* LAMI005, *Bacillus sp.* Jag 248, *Bacillus sp.* Jag 249, ICA 12, ICA 24 e ICA 56;
- Avaliar a produção de biossurfactantes em presença de diferentes meios de cultivo, comparando o uso de suco de caju clarificado (co-produto agroindustrial) e meios sintéticos que empregam como fonte de carbono glicose e frutose ou apenas glicose;
- Avaliar a inibição de crescimento do micro-organismo selecionado na presença de diferentes contaminantes como óleo de girassol e oliva usado e virgem, óleo de motor usado e petróleo, bem como seu poder de degradá-los uma vez que tais co-produtos são causadores de problemas ambientais se não forem descartados adequadamente, facilmente

encontrados e descartados pelos setores que os utilizam e com possibilidade de utilização como substratos alternativos;

- Realizar ensaios de produção de biossurfactante a partir da cepa selecionada e das condições de processo previamente estabelecidas;
- Caracterizar o biossurfactante produzido mediante análises quantitativas e qualitativas bem como por técnicas cromatográficas e espectrométricas, visando caracterizar suas estrutura química e propriedades físico-químicas;
- Estudar o potencial do biossurfactante em remover óleo de solos contaminados mediante testes de remediação *ex-situ*;
- Avaliar a biodegradabilidade e ectoxicidade em organismos aquáticos do biossurfactante produzido.

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biossurfactantes: características, propriedades e aplicações

Biossurfactantes são compostos ativos de superfície produzidos por microorganismos. Existem relatos de diversos tipos de biossurfactantes produzidos por diversos gêneros de bactérias com base em sua natureza química, tais como glicolípídeos, lipopolissacarídeos, oligossacarídeos, e lipopeptídeos (BANAT *et al.*, 2000). Estas estruturas conferem uma grande variedade de propriedades, incluindo a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos, a formação de micelas e emulsões entre duas fases distintas (SHAHIDZADEH *et al.*, 2000; RON & ROSENBERG, 2002). Os surfactantes facilitam a emulsificação através da formação de um filme adsorvido em torno das gotas dispersas, o que impede a floculação e a coalescência (BOYD *et al.*, 1972). Quando um dos líquidos se divide no interior de outro, se forma uma fase interna, dispersa ou descontínua, rodeada por uma fase externa, dispersante ou contínua. Com isso, o processo de emulsificação implica em um aumento importante da área interfacial, que se traduz em um aumento brusco da energia livre de superfície (BECHER, 1965; KHAN, 1996).

Biossurfactantes recebem atenção considerável devido seu promissor potencial no para reparação dos danos ambientais, tais como processos de biorremediação, lavagem do solo, dentre outros (THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT IBRAHIM M., 2010). Os mesmos influenciam nestes processos devido sua eficácia como agentes de dispersão bem como por suas características de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (MULLIGAN, 2005; DAS; MUKHERJEE, 2009; SIVAPATHASEKARAN *et al.*, 2010; KIRAN *et al.*, 2010; SATPUTE *et al.*, 2010). Apesar de serem potenciais agentes para todas as aplicações supracitadas, o uso de tais bioprodutos ainda não acontece na prática, necessitando mais estudos para se alcançar uma produção que gere custo benefício podendo assim despertar o interesse e a viabilidade se seu uso.

Surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar enquanto os biossurfactantes são classificados principalmente de acordo com sua composição química e origem microbiana.

A Tabela 1, apresenta os tipos de biossurfactantes e seus respectivos micro-organismos produtores.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e os microrganismos produtores.

Tipo de Biossurfactante	Micro-organismo
Glicolipídios	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: Desai & Banat, 1999; Nitschke e Pastore, 2002.

As maiores classes de biossurfactantes incluem: (1) glicolipídeos; (2) lipopolissacarídeos; (3) lipopeptídeos e lipoproteínas; (4) fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros; (5) surfactantes poliméricos e (6) surfactantes particulados (DESAI e BANAT, 1997; ZAJIC & SEFENS, 1984; BUGAY, 2012). Os lipopeptídeos são sintetizados por uma ampla gama de gêneros de micro-organismos, incluindo *Pseudomonas* e *Bacillus* (NISTSCHKE & PASTORE, 2002). Devido à sua excepcional capacidade de interagir com a membrana celular, os lipopeptídeos são bem conhecidos como antimicrobianos, embora na presença de compostos hidrofóbicos possam vir a agir como poderosos surfactantes exibindo uma ampla gama de atividades. Lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* em particular, são os mais conhecidos, sendo produzidos também iturina, subtilisina e gramicidina (COOPER *et al.*, 1981; NISTSCHKE & PASTORE, 2002; PERFUMO *et al.*, 2010). Esses biossurfactantes são produzidos por *Bacillus subtilis* através de síntese não ribossômica de peptídeos, que segue um mecanismo de linha de montagem, envolvendo intermediários ativos acoplados em regiões específicas de enzimas multifuncionais, produzindo a partir do crescimento microbiano antibióticos e biossurfactantes normalmente excretados para o meio de cultura (ETCHEGARAY *et al.*, 2004; CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S., 2007; ETCHEGARAY *et al.*, 2008).

Bacillus degradam hidrocarbonetos e produzem lipopeptídeos que são secretados para o meio onde se reúnem para formar micelas que atuam para solubilizar e emulsionar o substrato. Estes biossurfactantes são excelentes espumantes e em geral muito ativos no nível da interface líquido-líquido, devido às baixíssimas tensões interfaciais (IFT) de 0,01 mN/m, que os mesmos são capazes de gerar. Além disso, esses lipopeptídeos podem modular a hidrofobicidade bacteriana, devido sua capacidade de adsorção na superfície da célula expondo alternadamente o peptídeo cíclico (hidrófila) ou a extremidade da cauda de ácidos graxos (hidrofóbico) alterando assim as propriedades de superfície, em resposta às necessidades específicas (AHIMOU *et al.*, 2000; PERFUMO *et al.*, 2010).

A aplicação de biossurfactantes na remediação de compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos, visa aumentar a sua biodisponibilidade ou mobilização e remoção dos contaminantes por pseudosolubilização e emulsificação através de um tratamento de lavagem (BANAT *et al.*, 2010).

Os países industrializados vêm buscando substituir os produtos sintéticos pelos naturais, e dentre estas substituições os surfactantes estão sendo inseridos nessa tendência. A necessidade de aplicação de bioprodutos, substituindo compostos não biodegradáveis tem

recebido maior atenção nos últimos anos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A possibilidade de aplicação dos biossurfactantes em diferentes setores industriais tais como alimentos, cosméticos, agricultura detergentes e área médica justifica sua produção. No entanto, a indústria do petróleo recebe maior destaque, aumentando o interesse pela produção, incorporação nas formulações de óleos, uso na dispersão de derramamento de óleo no mar e em solos, emprego na remoção de lodo e óleo de tanques de estocagem, na descontaminação ambiental, em remediação, na recuperação melhorada do petróleo, dentre outras aplicações (FIECHTER, 1992; PIRÔLLO, 2006; BOGNOLO, 1999; KIM *et al.*, 2010). São poucos os relatos de aplicações em grande escala de biossurfactantes. Sabe-se que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de produzir biossurfactante do tipo ramnolipídeo, um detergente natural existente nos poços petrolíferos. Essa espécie de *Pseudomonas* transforma naturalmente fontes de carbono, como o petróleo, do qual se alimentam, num detergente biodegradável. O biossurfactante do tipo ramnolipídeo, produzido por *P. aeruginosa* foi testado em acidentes ambientais nos Estados Unidos, em 1989, no derramamento de óleo do navio petroleiro Exxon Valdez, no mar do Alasca, obtendo-se bons resultados. O produto foi desenvolvido pelo Centro de Engenharia e Desenvolvimento do Campo de Provas de Aberdeen do Exército norte-americano em parceria com a Universidade de Illinois, porém a tentativa de produção desenvolvidou utilizando outra cepa que produzia o mesmo surfactante (ramnolipídeo) não se tornou comercial, uma vez que não foi produzido em grande escala (DA SILVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, M., 2010).

Vantagens relacionadas à baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, variedade de estruturas químicas, estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e concentrações de sal, despertam o interesse por sua produção (NITSCHKE & PASTORE, 2002; FARIA, 2010; ABDEL-MAWGROUND & LÉPINE, 2010).

Uma das características avaliadas inicialmente para considerar a eficácia de um surfactante é determinada por sua habilidade em diminuir a tensão superficial (TS). O surfactante interage com a molécula de água e diminui o trabalho requerido para trazê-la à superfície. A concentração micelar crítica (CMC), menor concentração de surfactante na água onde ocorre a formação de micelas, é outro parâmetro utilizado para determinar a eficácia de um surfactante. As micelas são definidas como agregados moleculares contendo regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que se associam dinamicamente e espontaneamente em meio aquoso, a partir de uma determinada concentração crítica formando agregados moleculares de dimensões coloidais. Abaixo da CMC o tensoativo está predominantemente na forma

monomérica (HINZEL, 1979). As micelas são termodinamicamente estáveis, no entanto, são facilmente destruídas com a adição de água, pois propicia que a concentração do tensoativo fique abaixo da CMC (PELIZZETI & PRAMAURO, 1987). Após atingir a CMC, mesmo com o aumento da concentração de surfactante na solução, a TS permanece constante. Fatores como pH, temperatura e força iônica influenciam diretamente na CMC (OBERBREMER, MULLER-HURTIG, WAGNER, 1990; SAMSON *et al.*, 1990).

Em comum com todas as moléculas que atuam em superfícies, os biossurfactantes contêm um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos. Os grupamentos lipofílicos podem ser uma proteína ou um peptídeo, apresentando partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos. Já os grupos hidrofílicos são ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos (BOGNOLO, 1999; MORIKAWA *et al.*, 1993 apud COLLA & COSTA, 2003).

Segundo Rosenberg e Ron (1999), existem biossurfactantes de baixo e alto peso molecular. Suas características são:

- Biossurfactantes de baixo peso molecular: apresentam maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos;
- Biossurfactantes de alto peso molecular: Maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água.

Em síntese, os biossurfactantes são capazes de emulsificar diversos hidrocarbonetos, aumentando sua solubilidade em água, diminuindo a tensão interfacial e ainda favorecendo o deslocamento das substâncias oleosas agregadas às partículas do solo, por exemplo (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA 2000; LIMA, 2007).

As características apresentadas pelos biossurfactantes, em especial vantagens em relação aos surfactantes convencionais sintéticos, tem despertado o interesse pela busca do seu uso (NITSCHKE & COSTA, 2007). A literatura apresenta dados de atividade superficial e interfacial mostrando que os biossurfactantes são bem mais efetivos que os surfactantes sintéticos, como os detergentes aniônicos sulfatados, por produzirem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (BOGNOLO, 1999; COOPER & PADDOCK 1984). A medida de eficiência de um biossurfactante é a sua concentração micelar crítica (CMC), que varia entre 1,0 e 2000 mg/L e a tensão interfacial em fases óleo/água e superficial fica em torno de 1,0 e 30 mN/m respectivamente, de acordo com estudos realizados sobre esses biotensoativos (BOGNOLO, 1999). Quanto menor a CMC mais eficiente é considerado o biossurfactante (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011) especialmente do ponto de vista

econômico para aplicações industriais. A Figura 1 mostra um esquema ilustrativo que representa a acumulação de biossurfactantes na interface entre líquido e ar.

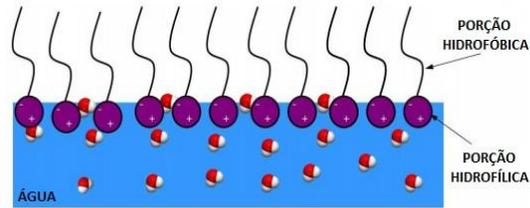


Figura 1 - Esquema representativo da acumulação de biossurfactantes na interface entre líquido e ar. (Fonte: PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

Biossurfactantes com grande atividade podem diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores em torno de 30 mN/m ou até mias baixos e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano, por exemplo, de 40 mN/m para 1 mN/m (DESAI & BANAT, 1997; SOBERÓN-CHÁVEZ & MAIER, 2011). A atividade dos biotensioativos dependem da sua concentração em solução até que a concentração micelar crítica (CMC) seja obtida. Em concentrações acima da CMC, as moléculas de biossurfactante associam-se para formar micelas, bicamadas (Lamelas) e vesículas (PIRÔLLO, 2006). Por exemplo, micelas em uma solução aquosa, o grupo polar da micela vai estar orientado para fora e a porção apolar para dentro enquanto no óleo o grupo polar estará orientado para dentro das micelas e a porção apolar para fora (MAIER, 2003). Observa-se Figura 2 um esquema da relação entre concentração do biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas.

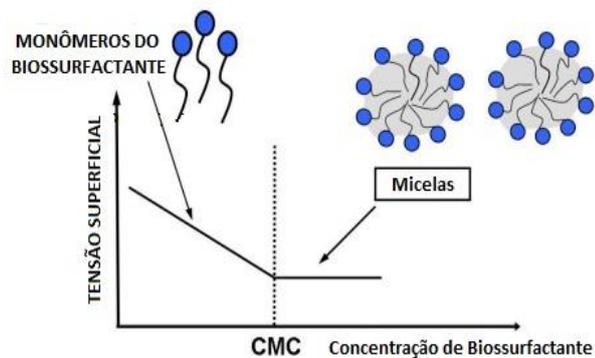


Figura 2 - Relação entre concentração de biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas. (Fonte: WHANG et al., 2008).

Segundo Whang e colaboradores (2008), a formação de micelas pelos biosurfactantes permite reduzir a tensão superficial e interfacial onde os mesmos estiverem presentes e aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos. Já a formação das microemulsões não tem relação significativa com a CMC (NGUYEN *et al.*, 2008). As microemulsões são misturas líquidas claras e estáveis de domínios de água e óleo separados por monocamada ou agregados de biosurfactantes e formam-se quando uma fase líquida é dispersa como gotículas em outra fase líquida, por exemplo, óleo disperso em água denominada uma microemulsão direta, ou água dispersa em óleo, uma microemulsão invertida (DESAI & BANAT, 1997).

Outra característica bastante relevante dos biosurfactantes é sua elevada tolerância à temperatura, pH e força iônica, podendo ser utilizados em condições drásticas para esses parâmetros. *Bacillus licheniformis* JF-2 excreta um biosurfactante do tipo lipopeptídeo, estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas e pH entre 5,0 e 12,0 (HOROWITZ *et al.*, 1990). A maioria dos biosurfactantes suportam concentrações em torno de 10% de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2 a 3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE & COSTA, 2007).

Dentre diversas aplicações dos biosurfactantes, destacam-se ainda o uso na área médica, podendo ser citada a surfactina entre os tensoativos mais conhecidos, que possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, a formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral, dentre outros (PEYPOUX *et al.*, 1999). A surfactina, lipopeptídeo cíclico, produzida por linhagens de *Bacillus sp.*, é composta por uma estrutura de anel de sete aminoácidos ligado a uma cadeia de ácido graxo por meio de ligação de lactona, possuindo capacidade de reduzir a tensão superficial de 72 mN/m para 27,9 mN/m, em concentrações tão baixas quanto 0,005%. A iturina, um dos surfactantes também excretados por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (THIMON *et al.*, 1995). Valraeds-Martine e colaboradores (1996) ao verificarem a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biosurfactante produzido por *Lactobacillus*, sugeriram o desenvolvimento de agentes anti-adesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes. Tal estudo utilizando biosurfactantes está despertando interesse dos pesquisadores cada dia mais, inclusive estudos com linhagens de *Bacillus sp.*

Em aplicações na agricultura, os biossurfactantes são muito usados na hidrofilização de solos argilosos, para obter boa umidade e auxiliar na distribuição uniforme de fertilizantes (NITSCHKE & COSTA, 2007). A literatura também reporta a utilização de bioemulsificantes na formulação de herbicidas e pesticidas, pois os compostos ativos dessas formulações são, geralmente hidrofóbicos, necessitando a adição de agentes emulsificantes para dispersá-los em meio aquoso (ROSENBERG; RON, 1999).

A Tabela 2 apresenta algumas aplicações de biossurfactantes reportados na literatura.

Tabela 2 - Funções dos biossurfactantes e suas aplicações.

Função do Biossurfactante	Aplicações
Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química em geral
Solubilização	Alimentícia, cosmética, farmacêutica, papel, plásticos e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, petrolífera, plásticos, curtumes, biorremediação e têxtil
Detergente e formadores de espuma	Curtumes, produtos para agricultura, indústria química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizadores	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de Resíduos
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia e cascalho	Construção civil

Fonte: SINGH *et al.*, 2007; NITSCHKE & PASTORE, 2002; KOSARIC *et al.*, 1987.

Apesar das inúmeras vantagens relatadas, a aplicação de biossurfactantes em larga escala é ainda bastante limitada, devido a diversos fatores, destacando-se dentre eles o seu alto custo de produção. A área de aplicação ambiental, é a que está mais desenvolvida, uma vez que nesse setor os requisitos exigidos em relação à pureza são baixos. Os biossurfactantes aceleram a degradação microbiana de vários óleos devido a sua capacidade de aumentar a interação interfacial água-óleo e, assim, promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995; BUGAY, 2009). Em relação ao uso ligado a indústria petrolífera, os biossurfactantes podem ser aplicados em recuperação avançada de petróleo melhorando a drenagem de óleo em poço, estimulando a liberação de óleo aprisionado por capilares, no molhamento de superfícies sólidas, ajudam a reduzir a viscosidade do óleo e petróleo ao ponto de fluidez, reduz a tensão interfacial, solubilizando o petróleo, dentre diversas outras funções. Os biossurfactantes atuam ainda como de-emulsificantes de emulsões de óleo, solubilizantes de óleo, redutores da viscosidade e como agente molhante (SINGH *et al.*, 2007). Silva e Kiperstok (2000) definem desemulsificantes como produtos químicos que, dependendo da sua afinidade, desemulsificam e desestabilizam as emulsões de água em óleo ou de óleo em água. Nas emulsões de água em óleo, os desemulsificantes agem na superfície das gotículas de água, de modo que estas se rompam. Nas emulsões de óleo em água, os aditivos devem ser solúveis na água e agir na superfície das gotículas do óleo emulsionado, fazendo com que se coagulem e se separem da água.

3.2. *Bacillus subtilis* e a produção de biossurfactantes

O uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial tem sido uma alternativa para a produção de biossurfactantes em escala comercial. O aproveitamento de resíduos industriais e agroindustriais vem sendo incentivado por contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como por permitir a valorização dos resíduos que seriam descartados (NITSCHKE & PASTORE, 2003; LIMA, 2008).

Apesar de todas as características apresentadas pelos surfactantes de origem microbiana, o mesmo ainda não é economicamente competitivo. Os altos custos de produção vêm sendo amenizados com a utilização de matérias-primas de baixo custo, como os co-produtos e resíduos industriais e agroindustriais (MERCADÉ e MANRESA, 1994;

MUKHERJEE *et al.*, 2006), porém os métodos para recuperação do produto são um tanto quanto ineficientes (FOX & BALA, 2000), podendo ser citadas extrações do tipo líquido-líquido onde há perda de bioproduto no processo e ainda arraste de outros bioprodutos indesejados presentes no meio, necessitando de outras etapas de purificação, aumentando ainda mais o custo do processo. Como os processos de produção requerem métodos eficientes de recuperação do composto produzido, diferentes técnicas têm sido usadas nos processos de extração, podendo ser citados a ultracentrifugação (MUKHERJEE *et al.*, 2006), a ultrafiltração (SEN & SWAMINATHAN, 2005), a precipitação com ácido ou sal (SEN & SWAMINATHAN, 2004) e a extração por solvente e adsorção por cromatografia (DUBEY, 2005).

No Brasil estima-se que a área ocupada com cultivo do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) corresponde a aproximadamente 723.928 ha, com produção média de 737.859.346 t. A região Nordeste respondeu no ano de 2013, com cerca de 100% da área colhida e da produção nacional. Os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte produziram 58,8%, 19,2% e 15,2% respectivamente, responsáveis por cerca de 93,2% da área cultivada no país de acordo com dados divulgados pelo IBGE para safra de castanha de caju de 2013 (Safra de caju, IBGE, 2013). Calcula-se que seja utilizado apenas de 15% a 20% da polpa na fabricação de doces, sucos, vinho ou consumo *in natura* e que 80% sejam desperdiçados. Ainda há grande perda do pseudofruto no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento da castanha, no entanto, ressalta-se que o pseudofruto não interessa a maioria das empresas (GARRUTI *et al.*, 2003), exceto as produtoras de suco. Dentro deste contexto, e ainda, dentro do âmbito regional, especificamente a agroindústria do estado do Ceará, o suco de caju é um potencial substrato a ser estudado para a produção de biossurfactantes, especialmente por ser rico em fontes de carbono como glicose e frutose, dentre outros nutrientes tais como ferro, manganês, magnésio, proteínas, importantes para que a biossíntese de biossurfactante ocorra (ROCHA *et al.*, 2006).

Devido ao fato do curto tempo de geração dos micro-organismos, comparativamente ao crescimento de animais, plantas e outros, a produção de biossurfactantes por via microbiológica é considerada como a forma mais promissora de se produzir esses compostos (LANG, 2002).

B. subtilis é uma rizobactéria gram-positiva, esporulante, produtora de diversos metabólitos secundários (STEIN, 2005). Vários estudos vem sendo realizados sobre a

otimização dos meios líquidos para fermentação submersa (FS) e condições de cultura para obtenção biossurfactantes produzidos por cepas do gênero *Bacillus*. O acompanhamento da produção de biossurfactantes no meio de cultura, quando realizado em fermentação submersa, é geralmente seguida qualitativamente pela determinação da tensão superficial (TS) do sobrenadante do cultivo livre de células e quantitativamente por técnicas cromatográficas como a CLAE para a análise de lipopeptídeos (SANTOS, 2001).

Cepas de *Bacillus* têm sido indicadas para produção de surfactina, um lipopeptídeo cíclico consistindo de um ácido graxo de 14 a 15 carbonos ligado a um peptídeo com 7 resíduos de aminoácidos (COLLA & COSTA, 2003). Fox e Bala (2000) utilizando um meio rico em amido, simulando os resíduos de indústrias de processamento de batatas para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, verificaram através dos resultados que o micro-organismo foi capaz de degradar substratos para a produção do biossurfactante, apresentando redução na tensão superficial de $71,3 \pm 0,1$ para $28,3 \pm 0,3$ mN/m no meio formulado, e redução para $27,5 \pm 0,3$ mN/m em um meio contendo amido comercial e sais minerais, indicando o potencial de produção pela bactéria estudada. LIN e colaboradores (1998) obtiveram concentração de 391 mg/L do biossurfactante produzido por um mutante de *Bacillus licheniformis* em meio mineral suplementado com glicose e incubado a 42 °C e 200rpm. Kim e colaboradores (1997) ao avaliarem a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* C9 utilizando como fontes de carbono glicose, óleo de soja ou n-hexadecano, verificaram que na presença de hidrocarbonetos, houve inibição da produção do biossurfactante, sendo a produção favorecida com glicose como fonte de carbono e em condições limitantes de oxigênio. De acordo com Colla e Costa (2003) a produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.* provavelmente ocorre devido a mecanismos de proteção da célula ao ataque de outros micro-organismos.

A variação nos rendimentos obtidos da produção de surfactina se deve principalmente às condições de processo e/ou nutricionais (SHEPPARD & MULLIGAN, 1987). Wei e Shu (1998) ao estudarem o aumento da produção de surfactina em meios enriquecidos com ferro por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, descobriram que o ferro, dependendo da concentração utilizada, pode induzir a uma elevada produção de surfactina, bem como o crescimento da biomassa, e indução a comportamentos de fermentação acidogênica que tem grande impacto sobre a cinética de produção de surfactina. Cooper e colaboradores (1981) demonstraram a importância da fonte de nitrogênio e os efeitos estimulatórios do ferro e do manganês para a produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.*,

bem como a forte influência da relação nitrogênio/ferro/manganês e C/N. Peypoux e colaboradores (1999) relataram em seus estudos sobre as tendências na bioquímica de surfactina que a sacarose e a frutose são as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de biossurfactantes. Segundo Banat (1995), a fonte de nitrogênio é um dos fatores que exercem grande influência na produção de biossurfactantes, contribuindo para um bom rendimento no final do processo.

Al-Ajlani e colaboradores (2007) ao avaliarem a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* MZ-7 cultivado em meio comercial obtiveram um rendimento de 300 mg/L utilizando sacarose como fonte de carbono, suplementado com ferro. Wei e colaboradores (2007) ao realizarem estudo usando métodos de desenho experimental Taguchi para otimizar a composição do elemento de traço para uma maior produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, avaliaram a influência de elementos-traço para produção da surfactina obtendo um rendimento de 3,34 g/L com a adição de 40 mmol/L de Mg^{+2} e 10 mmol/L de K^{+} .

Para obter um desenho de bioprocesso que apresente bom desempenho, todos os fatores relatados são importantes, no entanto, outros parâmetros devem ser levados em consideração. Os critérios utilizados para a obtenção e otimização de um processo de fermentação depende do produto que se deseja obter. Assim, os critérios utilizados para um produto de alto volume/baixo valor agregado normalmente são completamente diferentes dos critérios utilizados para um produto de alto valor agregado/baixo volume. Para os produtos que pertencem à primeira categoria (que inclui produtos tais como células, a maior parte dos principais metabólitos, muitos metabólitos secundários, a maioria das enzimas industriais e a maioria dos polissacarídeos) os três parâmetros de concepção mais importantes são os seguintes:

- Rendimento do produto sobre o substrato (típica unidade: grama de produto por grama de substrato);
- Produtividade (unidade típica: g do produto por volume do reator (L) por hora);
- Rendimento final (unidade típica: g do produto por volume do reator (L)).

O Rendimento do produto sobre o substrato é muito importante, pois as matérias-primas, muitas vezes são responsáveis por uma parte significativa dos custos totais de produção, bem como a produtividade, pois isso garante uma utilização eficiente da capacidade de produção, ou seja, os biorreatores. Especialmente em um mercado crescente que é um importante aumentar a produtividade, uma vez que isso pode inviabilizar novos investimentos de capital. A produtividade ou rendimento final é importante para o futuro tratamento do meio

de fermentação, como por exemplo, a purificação do produto. Assim, se o produto estiver presente numa concentração muito baixa no final da fermentação, pode ser muito dispendioso extraí-lo, mesmo para um meio com rendimento satisfatórios (NIELSEN, 2002, p. 41).

3.2.1. Linhagens de *Bacillus sp.* produtoras de biossurfactantes isoladas de diversos ambientes

Micro-organismos produtores de biossurfactantes têm sido isolados de vários ambientes, como solo, água do mar, sedimentos marinhos, estações depuradoras de tratamento de águas residuais, entre outros. Bodour e colaboradores (2003) relataram a presença de micro-organismos produtores de biossurfactantes em solos, e verificaram que pelo menos um micro-organismo produtor foi encontrado em 20 dos 21 tipos de solo estudados, dentre eles os solos não-contaminados, solos contaminados com hidrocarbonetos, solos contaminados com metais ou contaminados com metais e hidrocarbonetos.

Devido ao fato de encontrar relatos na literatura de uma vasta gama de micro-organismos promissores na produção de biossurfactantes isolados de vários ambientes, o presente estudo utilizou cepas isoladas de uma estação de tratamento de esgoto do campus do Pici (Universidade Federal do Ceará - UFC) e, posteriormente, cepas isoladas de solo de manguezais do Ceará, Brasil. Todas as linhagens estudadas pertencem à coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Barreto (2011) e Lima (2013) isolaram e estudaram diversas cepas isoladas de manguezais do Ceará. Constataram que os solos de manguezais representam ricas fontes de micro-organismos produtores de tensoativos, os quais podem pertencer a classes já conhecidas ou novas classes dessas biomoléculas. Segundo Braddock e colaboradores (1996) afirmam que as populações de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos contaminados com petróleo são maiores do que nos não contaminados, explicando assim a presença de bactérias produtoras de tensoativos nos manguezais, pois sabe-se que entre as agressões sofridas pelas áreas de manguezal, podem ser destacados os derramamentos de petróleo, que ocorrem normalmente devido a atividades portuárias e industriais, com o transporte de petróleo e seus derivados pela indústria petroquímica. Lima (2013), ao realizar o "estudo da frequência de isolados bacterianos

produtores de surfactantes lipopeptídicos em sedimentos de dois manguezais do Ceará" obteve 200 isolados, destacando 65 deles pela produção de biossurfactantes, dos quais 18 são produtores de surfactina determinados pelo resultado do teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) para os genes *sfp* (envolvido na síntese da surfactina), *ituD* e *lpa14* (envolvidos na síntese da iturina).

3.3. Metodologias utilizadas para caracterização de biossurfactantes

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a identificação e caracterização de biossurfactantes. Dentre elas podem ser citadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia de infravermelho (IV), a espectroscopia de massa (EM). Podem ser citadas ainda outras técnicas espectroscópicas melhoradas que estão disponíveis atualmente como NMR, MS com Bombardeamento de Átomos Rápidos (FAB-MS) e a Ionização/Desorção a Laser Assistida por Matriz com Tempo de Voo (MALDI-TOF), que podem determinar estruturas de biossurfactantes em tempos mais curtos utilizando pequenas quantidades de amostras (BODOUR *et al.*, 2004; FELIX, 2012).

FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há mais de 10 anos na identificação de substâncias desconhecidas. A técnica FTIR permite uma rápida avaliação e identificação de uma grande variedade de produtos químicos. Uma das grandes vantagens desta técnica é a possibilidade de analisar amostras em praticamente qualquer estado físico. A introdução de espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) melhorou a qualidade dos espectros no infravermelho e minimizou o tempo necessário para obtenção de dados (STUART, 2004).

A espectroscopia FTIR é uma variação da espectroscopia IR, a qual propicia vantagens como maior rapidez, alta reprodutibilidade e alta razão sinal/ruído. De tal maneira, constitui-se uma análise não destrutiva (ZENG *et al.*, 2007; SKORNYAKOV *et al.*, 2008). Para seu funcionamento, utiliza-se de um feixe infravermelho que atravessa a amostra e detecta seus grupos funcionais expressos em vibrações moleculares, os quais refletem características químicas e bioquímicas da substância analisada. A espectrometria de massa (MS - Mass Spectrometry) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do

peso molecular e de características estruturais das amostras que se deseja avaliar. É considerada uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis aos cientistas, capaz de fornecer diversas informações sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (Espectrometria de Massa, 2013). Em termos práticos, a detecção por espectrometria de massa pode ser efetuada em dois modos distintos: varrimento total, em que são monitorados todos os íons fragmentos formados e modo de íons pré-selecionados (Selected Ion Recording - SIR ou Selected Ion Monitoring - SIM, designação do fabricante) em que apenas são monitorados os íons previamente considerados como sendo de interesse para a caracterização (BORGES, 2007). Operações com detector de massas em modo SIR proporciona excelente sensibilidade com uma elevada especificidade, possibilitando inclusive, análise quantitativa.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em inglês, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* é uma técnica analítica de separação amplamente empregada nas indústrias químicas, farmacêuticas, radiofarmacêuticas, alimentícias, refinarias, cosméticos, petroquímicas, laboratórios de análises clínicas, ambiental e forense, além de aplicações nas áreas médicas e em muitos outros campos da ciência e da pesquisa. A capacidade de separar espécies em misturas complexas fez da CLAE/HPLC uma técnica essencial para fins qualitativos e quantitativos. A Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utiliza colunas fechadas compostas por partículas muito finas que proporcionam separações muito eficientes, podendo ser utilizadas altas pressões para forçar a passagem do solvente e assim diminuir o tempo da análise (HARRIS, 2005).

Pereira e colaboradores (2013) em estudos de otimização da produção de biossurfactantes utilizaram técnicas de FTIR, MS e RMN para caracterização do biossurfactante produzido. Felix (2012), em estudos de caracterização do biossurfactante produzidos por *B. subtilis*, também utilizou as técnicas de FTIR, MS e Espectroscopia de Massa de Alta Resolução (EMAR), para elucidação do biotensoativo produzido, bem como fez uso de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE). Freitas de Oliveira e colaboradores (2013) caracterizou um biossurfactante produzido por uma linhagem de *Bacillus* por técnicas de CLAE e FTIR. Sousa e colaboradores (2012) e Sousa (2014) também utilizaram a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) para elucidarem o biossurfactante produzido em seus respectivos estudos.

3.4. Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos e biotensoativos

3.4.1. Toxicidade de tensoativos e biotensoativos à organismos aquáticos

Os ecossistemas aquáticos têm sido fortemente alterados nas últimas décadas em função de múltiplos impactos ambientais decorrentes de atividades antrópicas. Rios, córregos, lagos e até mesmo reservatórios têm sido fortemente impactados devido ao aumento desordenado de atividades humanas (McALLISTER *et al.*, 1997). Conseqüentemente, os ecossistemas aquáticos, em especial os urbanos vêm perdendo cada dia mais suas características naturais e sua diversidade biológica (SHEPP & CUMMINS, 1997).

Sabe-se que existem poucos dados disponíveis na literatura sobre a toxicidade dos agentes de superfície microbianas. Devido ao fato de uma legislação ambiental cada vez mais restritiva, testes de biodegradabilidade e toxicidade em organismos aquáticos como bioindicadores têm sido cada vez mais usados como critérios importantes na seleção de tensoativos a serem empregados em detergentes domésticos e industriais (MADSEN *et al.*, 1996).

A indústria mundial vem descarregando uma ampla gama de surfactantes ou agentes de superfície, dejetos de suas instalações de tratamento de águas residuais. Uma vez utilizados os surfactantes entram nos corpos de água, levando ao acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas e prejudiciais, acarretando sérios problemas ambientais se permanecerem ali por muito tempo (DESCHENES *et al.*, 1996; ABD-ALLAH, 1995; SHARREL REBELLO *et al.*, 2014). A presença de concentrações entre 0,4 e 40 mg/L de determinadas classes de surfactantes em efluentes não tratados são suficientes para constituir problemas de toxicidade para os organismos aquáticos (ABEL, 1974; ANKLEY & BURKHARD, 1992). Existem extensas pesquisas sobre a toxicidade de surfactantes comerciais (LEWIS, 1991; CHATURVEDI & KUMAR, 2010), no entanto, a avaliação do perfil de poluição de surfactantes é relevante, pois devido à contínua descarga destes compostos, os mesmos podem alcançar concentrações elevadas em algumas áreas. Sharrel Rebello e colaboradores (2014) relataram várias pesquisas sobre a toxicidade, biodegradação e eliminação segura dos surfactantes aniônicos, sendo mais comumente usados e explorados o dodecilsulfato de sódio (SDS) e alquil linear benzeno sulfonato (LAS). É de suma

importância obter informações sobre a via metabólica e mecanismo molecular de degradação de surfactante, bem como métodos e alternativas para combater o problema da contaminação com surfactantes. Os surfactantes sintéticos são bem mais agressivos que os biotensoativos produzidos por micro-organismos, portanto, tem-se intensificado a pertinência e utilidade de biossurfactantes como uma alternativa aos detergentes sintéticos atuais (SHARREL REBELLO *et al.*, 2014).

Em linhas gerais, as concentrações de detergentes em águas residuais oscilam entre 1,0 e 20,0 mg/L enquanto em águas superficiais está em torno de 0,5 mg/L. A partir de 0,2 mg/L de tensoativos presente na água é possível detectar sabor e a formação de espumas a partir de 0,3 mg/L. A presença de 2,5 mg/L em água afetam o crescimento de plantas e concentrações entre 5,0 e 6,0 mg/L são tóxicas para algas e peixes em geral (MARTÍN, 1995). Esses dados são informados para uma ampla gama de tensoativos sintéticos.

Sandrin e colaboradores (2000) relataram que os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos. Os autores reportam que o ramnolípido produzido por *P. aeruginosa* é capaz de complexar metais catiônicos como cádmio (Cd^{2+}), chumbo (Pb^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) e demonstraram ainda que o ramnolípido eliminou a toxicidade do cádmio, quando adicionado em uma concentração 10 vezes superior à concentração do metal.

Silva (2012), ao estudar sobre resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria do petróleo utilizando *Pseudomonas cepacea* CCT6659, avaliou a toxicidade do biosurfactante produzido frente a um microcrustáceo e a sementes de vegetais. Nos testes realizados com o biossurfactante bruto observou ausência de toxicidade frente ao micro-organismo *Artemia salina* e a duas variedades de repolho (*Brassica oleracea*).

Daphnia magna é uma espécie de *Daphnia* do reino Animalia, filo Arthropoda e subfilo crustáceo da ordem Cladocera, nativo do norte e oeste da América do Norte, Eurásia e algumas regiões da África (*Daphnia magna*, Straus, 1820; Taxonomic Serial No.: 83884). Estes microcrustáceos fazem parte do zooplâncton de água doce e alimentam-se por processos de filtração de substâncias orgânicas sob forma de partículas. Atua como consumidor de mais baixa ordem em sua função ecológica, entre os produtores primários (algas) e os detritívoros (bactérias). O uso de *Daphnia magna* para testes de ecotoxicidade é vantajoso em vários aspectos. Dafinídeos são pequenos, atingindo uma dimensão de cinco milímetros, de modo que um grande número pode ser criado num pequeno espaço.

Bioensaios com *Daphnia magna* e nematóides são usados para avaliar o impacto tóxico de hidrocarbonetos em água antes e depois de um processo de mediação Biore (DIAMANTINO *et al.*, 2000). *Daphnia* é um gênero fundamental em corpos de água doce, pois são animais herbívoros eficazes sobre o fitoplâncton e é um alimento favorito de vertebrados e invertebrados predadores. A espécie *Daphnia magna* é amplamente utilizada como um organismo de teste em provas de toxicidade aguda e crônica no campo da ecotoxicologia. Além disso, é sensível a muitos produtos químicos tóxicos (SARMA *et al.*, 2003; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2005). Os diferentes procedimentos internacionais padronizados, que incluem dafnídeos como organismos-teste para avaliação de toxicidade aguda e crônica de substâncias químicas e efluentes, recomendam a utilização das espécies *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*. A avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas em organismos aquáticos geralmente incluem ensaios de toxicidade crônica bem como ensaios de toxicidade aguda. Dafnídeos, especialmente *Daphnia magna*, tem sido utilizados por muitos anos em ensaios padronizados de toxicidade (OECD,1984) devido a sua grande sensibilidade, fácil manipulação e alta taxa reprodutiva (VILLARROEL *et al.*, 2003). Hernando (2003) descreve que em se tratando de zooplacton em particular, o gênero *Daphnia*, é frequentemente usado em ensaios ecotoxicológicos devido a este ser um dos grupos mais sensíveis aos químicos tóxicos, e devido ao fato deste organismo ocupar uma posição central na cadeia alimentícia de ambientes lânticos.

Sánchez-Leal (1995) relata que a toxicidade que os tensoativos apresentam em águas limpas é maior que em águas contaminadas, devido a adsorção dos tensoativos sobre a matéria orgânica em suspensão, reduzindo a quantidade de tensoativo na dissolução. O autor relata ainda que a toxicidade dos tensoativos deve-se fundamentalmente, a desestruturação que produzem nas membranas celulares, provocando um choque osmótico e alterações de permeabilidade das células. Devido a esses fenômenos, a maioria dos tensoativos apresentam-se mais tóxicos para espécies que possuem maior organização biológica, como peixes e menos tóxicos para as *Daphnia*.

Ruiz (2010) observou em seus estudos que *Daphnia magna* apresentou sensibilidade inferior a bactérias luminiscentes *Vibrio fischeri*, com IC₅₀ entre 3,48 e 383,44 mg/L para os tensoativos comerciais aniônicos e não iônicos avaliados. Outro fator relatado por Ruiz (2010) é que a toxicidade também está relacionada a estrutura química do tensoativo, onde os valores de toxicidade são maiores para os tensoativos que possuem cadeia carbonada de maior longitude e de menor grau de etoxilação.

Bioensaios de toxicidade envolvendo algas sob diferentes condições físicas, químicas e biológicas, precisam ser melhorados, com métodos mais sensíveis, de baixo custo e ecologicamente realistas. Esses organismos presentes em ecossistemas aquáticos incorporam energia solar em biomassa (fotossíntese), produzem oxigênio e apresentam importante papel na ciclagem de nutrientes dentre outras inúmeras funções no ecossistema aquático. Devido a sua importância trófica (ecológica) e sua sensibilidade a substâncias estressoras (poluição), as algas são usualmente utilizadas em bioensaios toxicológicos. (BASSFELD, 2001). Amostras da água da bacia da Pampulha, Belo Horizonte, MG, foram avaliadas frente à alga *Selenastrum capricornutum* com testes de 96 h de exposição. Os estudos realizados pelo Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Escola de Engenharia de São Carlos - USP mostraram efeito de inibição do crescimento da biomassa em relação ao controle, indicando toxicidade dos contaminantes presentes na água à esta espécie em todos os pontos de amostragem (principais tributários da lagoa da Pampulha, responsáveis pela entrada de efluentes industriais, e na própria lagoa). Apenas um dos pontos de amostragem, próximo ao aterro sanitário de BH apresentou toxicidade aguda para *Daphnia similis* (organismo também utilizado como bioindicador), com 100% de mortalidade (RIETZLER *et al.*, 1998).

Vibrio fischeri é uma espécie de bactéria heterotrófica gram-negativa encontrada em águas temperadas e subtropicais. Sua luminescência é utilizada como recurso para estudar a toxicidade das substâncias químicas que causam esse e feito quando presentes ambientes aquáticos. A bioluminescência de *V. fischeri* está relacionada a cinco genes, luxCDABE, que são regulados por luxR e luxI. A emissão de luz ocorre a partir da oxidação de compostos orgânicos. A diferença na quantidade de luz produzida pode, portanto, ser correlacionada com o metabolismo da bactéria. A redução da luz emitida é proporcional à toxicidade da amostra testada.

A realização de estudos ecotoxicológicos é de extrema importância para monitorar, avaliar e compreender a extensão dos impactos ocasionados pela contaminação da água, bem como possibilitar a criação de legislações e gerar informações para os setores responsáveis pela saúde pública e pelo ambiente, auxiliando na criação de políticas ambientais que possam garantir maior proteção ao meio ambiente (BARROS e DAVINO, 2003; BRIGANTE e ESPÍNDOLA, 2003). Ao estudar a toxicidade de um meio através de bioensaios, recomenda-se que se utilize mais de um organismo-teste adequado para as amostras coletadas, uma vez que a resposta de um único tipo de organismo pode diferir de

outro, sobretudo quando a natureza da substância teste não é conhecida (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). Testes ecotoxicológicos vêm sendo desenvolvidos a fim de disponibilizar metodologias mais adequadas aos mais diversos meios, como é o caso de *Hyaella azteca* e *V. fischeri* para sedimentos, se aprofundando no entendimento dos efeitos diretos ou indiretos de substâncias químicas para organismos-teste (HWANG *et al.*, 2009).

Vários autores relatam que bactérias *V. fischeri* apresenta-se mais sensível aos efeitos tóxicos dos derivados de ácidos aquil éter carboxílicos, como ocorre também para o tensoativo aniônico mais conhecido, o dodecil sulfato de sódio (RUIZ, 2010). Para *V. fischeri*, Ruiz (2010) obteve valores de toxicidade de EC₅₀ entre 0,354 e 211,05 mg/L ao avaliarem a toxicidade de tensoativos comerciais aniônicos e não iônicos sob esses organismos.

3.4.2. Biodegradabilidade de tensoativos e biotensoativos

Ao contrário de surfactantes sintéticos, os compostos produzidos por micro-organismos, são facilmente degradados na água e no solo, tornando-os adequados para aplicações ambientais, tais como biorremediação e dispersão de derramamentos de petróleo, tratamento de resíduos dentre outros (MULLIGAN, 2005; MOHAN *et al.*, 2006)..

Diversos fenômenos indesejados em águas residuais estão interligados com a presença de tensoativos. Esses contaminantes tem uma ação destrutiva sobre a fauna e a flora quando presente em águas superficiais provocando sua eutrofização (CARA, 2012). Elevadas porcentagens desses compostos são eliminados mediante processos de biodegradação e adsorção de sólidos em suspensão presentes nas águas, uma vez que os metabólitos gerados são dispersados em diferentes compartimentos ambientais (YING, 2006; CARA, 2012).

A biodegradação é o principal mecanismo de eliminação de compostos orgânicos no meio ambiente. O conhecimento da biodegradabilidade e toxicidade é uma necessidade para sua aplicação em formulações.

A biodegradação é influenciada por diversos fatores, dentre eles a CMC. Neste caso, o tensoativo com menor CMC apresenta maior biodegradabilidade, o que pode estar relacionado com a baixa presença do tensoativo no meio onde será degradado (JURADO, 2007 *apoud* RUIZ, 2010).

O crescimento do uso de surfactantes em processos de remediação de águas e de solos contaminados com poluentes orgânicos hidrofóbicos tem sido bastante limitado por falta de conhecimento sobre o destino desses compostos no ambiente, a biodegradação das moléculas e dos metabólitos intermediários, e ainda sobre a toxicidade quando aplicados *in situ* (HAIGH, 1996; FAVA & DI GIOIA *et al.*, 2004).

A maioria dos surfactantes podem ser degradados por micro-organismos. No entanto, a degradação de alguns surfactantes sintéticos por atividade microbiana pode levar à geração de metabólitos tóxicos (VAN GINKEL *et al.*, 1996).

Em análises comparativas descritas na literatura, os tensoativos biológicos geralmente apresentam toxicidade inferior a apresentada por tensoativos sintéticos (MULLIGAN, 2005). Uma das principais características que leva os biossurfactantes a estimularem a decomposição bacteriana de substâncias orgânicas hidrofóbicas é sua baixa toxicidade frente a bactérias e outros organismos unicelulares (MORAN *et al.*, 2000). A degradação biológica de surfactantes é o mais importante mecanismo para a remoção irreversível destas substâncias de ambientes aquáticos e terrestres e, por isso, a biodegradabilidade é considerada como uma característica importante em processo de avaliação quanto ao risco ambiental.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Processamento do pedúnculo de caju para obtenção do suco de caju clarificado utilizado como fonte de carbono e energia para produção de biossurfactantes

O pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale, L.*) foi processado na Embrapa Agroindústria Tropical na Universidade Federal do Ceará, de acordo com algumas etapas da metodologia de Melo e colaboradores (2000). Os frutos foram pré-selecionados, para retirar folhas, frutos estragados e outras sujeiras presentes e, em seguida, lavados em tanques com água clorada (10 ppm) e corrente de preferência. O suco foi extraído em prensas do tipo *expeller*, que é um tipo de prensa contínua em que a polpa do fruto alimenta um cilindro de paredes espessas contendo um parafuso rotativo polido de tamanho decrescente forçando o suco para uma tela de aço inoxidável perfurada e com abertura de 0,5mm aproximadamente. O suco extraído foi colocado em um recipiente de aço inoxidável para o processo de clarificação, onde se adicionou uma solução de gelatina (10%), agitando lentamente, até ocorrer floculação dos sólidos solúveis em suspensão, que ocorre quando a gelatina entra em contato com os taninos (ABREU & DA SILVA NETO, 2007). A dosagem da gelatina pode variar, de acordo com as características do caju (matéria-prima).

Após clarificação, o suco foi deixado em repouso por um período de quinze minutos a meia hora, para completa sedimentação dos sólidos solúveis. Finalmente, o suco clarificado foi filtrado para remoção da turbidez proveniente de precipitados, e distribuído em bombonas plásticas de 5 litros para armazenagem e mantido a -10 °C, sem adição de conservantes.

4.2. Micro-organismos

Utilizaram-se diferentes cepas de *Bacillus* previamente identificadas por seu gene 16S RNA ribossomal. Na Tabela 3 encontram-se a lista das cepas estudadas nesse trabalho.

Tabela 3 - Cepas de *Bacillus* utilizadas nesse trabalho e sua identificação com base na análise do gene rRNA 16S com o programa BLAST (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1997).

Cepa estudada	Número de Acesso no GenBank	Espécie mais relacionada no GenBank	Identidade acima de 100 pb (%)
LAMI 005	FJ413046	<i>Bacillus subtilis</i>	100
JAG 248		<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus velenzensis</i>	100
JAG 249	NI	NI	NI
ICA 24	NI	NI	NI
ICA 56	KM235112	<i>Bacillus subtilis</i>	99

Nota: NI - Não identificadas. Estas cepas ainda estão em fase de identificação.

Sendo:

- *B. subtilis* LAMI005 isolada de um tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará ETE-PICI (GIRO *et al.*, 2009; PAES *et al.*, 2012; FREITAS de OLIVEIRA *et al.*, 2013);
- *Bacillus sp.* Jag 248 e Jag 249, isoladas de solos do manguezal de Jaguaribe;
- *Bacillus sp.* ICA 24 e ICA 56, isoladas de solos do manguezal de Icapuí.

Todas as cepas pertencem a coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para manutenção dos micro-organismos utilizou-se 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, esterilizado a 121 °C por 15 minutos, distribuído em placas de petri e tubos rosqueados estéreis em capela microbiológica, inoculadas e, em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 horas. A cultura foi mantida sob refrigeração a 4 °C e repicada a cada 60 dias.

4.3. Inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo com composição similar aos meios preparados para realização da fermentação, sendo:

Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil)

- Suco de caju clarificado como fonte de carbono e energia: foi utilizado suco de caju clarificado como fonte de carbono com concentração inicial de $\pm 20,0$ g/L de ART (Açúcares Redutores Totais - glicose e frutose) e adição de 1,0 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) ajustando-se o pH para 7,0;
- Meio mineral (Padrão analítico - P.A): para essa condição de meio de cultivo, utilizou-se meio mineral segundo Moran e colaboradores (2000), com modificações, e adição de 0,1 % de solução de micronutrientes, e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono para propagação do inóculo. As Tabelas 4 e 5 apresentam a composição do meio de cultivo e da solução de micronutrientes utilizados nos ensaios para produção de biossurfactantes.

Tabela 4 - Composição do meio mineral (MM).

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

NOTA: Concentração utilizada pelos autores: 27 g/L; modificado para 2,7 g/L. (Fonte: Morán *et al.*, 2000).

Tabela 5 – Composição da solução concentrada 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.

Os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 minutos. Posteriormente, três colônias de cultura das bactérias a serem avaliadas, previamente incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 horas, em placas petri contendo meio APGE, foram transferidas para o meio de cultivo estéril e incubadas em agitador rotatório (*Shaker* Tecnal TE-480) por 24 horas, a 30 °C, 180 rpm para *Bacillus subtilis* LAMI005 e 150 rpm para as linhagens Jag 248, Jag 249, ICA 24 e ICA 56. Após 24 horas, a concentração do inóculo foi ajustada para uma faixa entre 0,15 – 0,20 em espectrofotômetro a 600 nm com um meio de cultivo previamente esterilizado e composição similar a do inóculo.

4.4. Meios de cultivo e produção em agitador rotatório de bancada

Utilizaram-se diferentes meios de cultivo para produção de biossurfactante pelas diferentes linhagens de *Bacillus sp.* a serem estudadas. Utilizou-se suco de caju clarificado como fonte de carbono e energia com concentração inicial de $\pm 20,0$ g/L de ART (Açúcares Redutores Totais - glicose e frutose) e adição de 1,0 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) ajustando-se o pH para 7,0. Para ensaios realizados utilizando meio mineral utilizando glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono seguiu-se a composição do meio de cultivo descrito por Moran e colaboradores (2000) com modificações, e adição de 0,1 % de solução de micronutrientes conforme descritos no item 4.3 e Tabelas 4.2 e 4.3. Os meios de cultivo foram distribuídos em erlenmeyers com capacidade de 250 ml, contendo 50 mL de volume final para realização dos ensaios. Ajustou-se o pH do meio de cultivo a ser fermentado para 7,0 e esterilizou-se a 110 °C por 10 minutos para não caramelização dos açúcares. Testes preliminares foram realizados para avaliação da eficácia da esterilização, obtendo-se resultados positivos, portanto a citada condição de esterilização foi adotada. Adicionou-se aos meios de cultivo 10% (v/v) de inóculo com absorbância previamente ajustada a 600 nm para uma faixa de 0,15 - 0,20 (600 nm) e incubou-se por até 48 ou 72 horas a 30 °C, 180 rpm (*B. subtilis* LAMI005) e 150 rpm (Jag 248; Jag 249; ICA 24; ICA 56). O tempo foi determinado de acordo com a finalidade do ensaio a ser realizado, sendo 48 horas apenas para produção e recuperação da surfactina e até 72 horas com retirada de amostras em intervalos no decorrer desse tempo para estudo cinético.

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Concentração de Biomassa: Curva de calibração e acompanhamento do crescimento celular

Acompanhou-se a concentração de biomassa pela medição da densidade óptica (D.O) a 600 nm, em espectrofotômetro (Genesys, série 20) durante o ensaio fermentativo. O procedimento consiste em adicionar 3 alçadas de colônias do micro-organismo, após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 30 °C, ao meio de cultivo para inóculo descrito no item 4.3 para propiciar o crescimento do micro-organismo. Colocou-se em agitador rotatório a 30 °C, 150 rpm por 24 horas (180 rpm apenas para *B. subtilis* LAMI005). Após esse período, centrifugou-se a 1000 g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Em seguida as células foram lavadas e centrifugadas três (03) vezes para remover completamente qualquer resíduo dos componentes do meio e posteriormente re-suspendidas em 30 mL de água destilada. Da suspensão de células, distribui-se em triplicata, 5,0 mL em cadinhos de porcelana e coloca-se em estufa a 60 °C, durante 24 horas. Após esse período realizam-se pesagens em intervalo de 60 minutos, até que se obtenha peso constante, segundo metodologia de Reis e colaboradores (2004), com pequenas modificações. Pesou-se pelo menos três vezes. Com o restante da solução concentrada de células fez-se diluições e mediu-se a absorbância a 600 nm para obtenção da curva de crescimento celular. A partir da curva obtida, pôde-se calcular a concentração celular nas amostras de caldo fermentado retiradas a cada intervalo de tempo no ensaio fermentativo.

4.5.2. Determinação da Concentração de Substrato

Determinou-se a concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo Waters (Modelo 2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 40 °C), coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm) e pré-coluna (5 cm x 4,6 mm) da Sigma Aldrich utilizando como

fase móvel 0,1% de H₃PO₄ em H₂O ultra pura (MiliQ), na vazão de 0,5 mL.min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL e o tempo de análise foi de 20 minutos, em duplicata.

4.5.3. Determinação da concentração de surfactina

Determinou-se a concentração de surfactina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), acoplado com detector UV e equipado com a coluna de fase reversa Symmetry C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, Irlanda). Utilizou-se fase móvel composta por 20% de solução de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80% de acetonitrila na vazão de 1,0 mL.min⁻¹ a 30 °C. O volume de injeção foi de 20,0 µL e o tempo de análise de 40 minutos. A surfactina foi identificada usando detector UV, modelo 2487 (Waters) com comprimento de onda de 205 nm.

4.6. Extração de biosurfactantes

Para extração de biosurfactantes, o caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos para separação da biomassa. Antes da remoção de células, verificou-se o pH, ajustando-se sempre para 7,0 quando o mesmo estava ≤ 5,0, uma vez que o biosurfactante precipita em pH ácido, podendo haver perdas do bioproduto juntamente com as células microbianas na centrifugação. É comum haver acidificação do meio durante o processo fermentativo da produção de biosurfactantes, porém não é uma regra, podendo acontecer ou não e vai depender de diversos fatores como tipo de micro-organismo, meio de cultivo, etc. Para extração e posterior quantificação do biosurfactante produzido, ajustou-se o pH de 20,0 mL do sobrenadante livre de células para 2,0 com HCl 3N. O meio acidificado foi deixado em repouso overnight a 4 °C para formação do precipitado. Após esse período, centrifugou-se a 10.000 g por 20 minutos, para recuperação do biosurfactante. Re-suspendeu-se o precipitado rico em biosurfactante, em 8,0 mL de água deionizada ajustando-se o pH para o mais próximo de 8,0 (7,5 a 8,0), por ser a melhor condição encontrada para completa diluição do precipitado. Posteriormente adicionou-se o mesmo volume de cloreto de metileno para

realizar uma extração líquido-líquido. Agitou-se a solução por 5 minutos, deixou-se em repouso por uma hora para separação do produto recolhendo em seguida em Becker de 100 mL. O procedimento foi repetido três vezes para melhor recuperação do produto. O solvente foi evaporado em capela química e o bioproduto foi posteriormente re-suspendido em metanol para quantificação e HPLC.

4.7. Caracterização físico-química

4.7.1. Determinação da tensão superficial do biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus sp.* LAMI005, Jag 248, Jag 249, ICA 24 e ICA 56

Para avaliação da produção de biossurfactantes foi realizado medidas de tensão superficial do caldo livre de células, a 25 °C, segundo o método de anel de Du Noüy, utilizando um tensiômetro Krüss, modelo K6 (du NÖUY, 1925). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura. Utilizou-se 30 mL de sobrenadante livre de células para cada amostra analisada. As análises foram realizadas em triplicata. A redução da tensão superficial foi calculada utilizando a Equação 4.1:

$$\text{Redução da Tensão Superficial} = \frac{TS_{t=Bco} - TS_{t=ti}}{TS_{t=Bco}} * 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Sendo:

$TS_{t=Bco}$ é a tensão do meio utilizado como branco, onde não foi colocado inóculo e $TS_{t=ti}$ refere-se a amostra dos intervalos de tempo analisadas.

4.7.2. Determinação do Índice de Emulsificação

Outro método indireto aplicado indicativo de produção de biossurfactantes estudado foi a determinação do índice de emulsificação. Amostras do meio fermentado livre de células rico em biossurfactante dos ensaios fermentativos realizados durante 72 horas, foram retiradas no período da fermentação e testadas quanto ao índice de emulsificação para produção de biossurfactantes por linhagens de *Bacillus sp.* LAMI005, Jag 248, ICA 24 e ICA 56. O método consiste em colocar uma alíquota de amostra de meio contendo o biotensoativo em tubo de ensaio, com fundo chato, adicionando o mesmo volume de diferentes fontes hidrofóbicas como óleo de soja, querosene e n-hexadecano. Agitou-se em vórtex por dois minutos, em alta rotação deixando a emulsão em repouso por 24 horas (COOPER e GOLDENBERG, 1987; MAKKAR e CAMEOTRA, 1997). Os testes foram conduzidos em duplicata. Após 24 horas, calculou-se o índice de emulsificação através da razão entre a altura da região emulsificada e altura total, de acordo com a Equação 4.2, proposta por WEI e colaboradores (2005).

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

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

4.8. Caracterização estrutural do lipopeptídeo produzido por linhagens de *Bacillus sp.*

4.8.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI 005 e *Bacillus subtilis* ICA 56

Os espectros vibracionais na região do infravermelho do surfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de

brometo de potássio (KBr), utilizando um espectrômetro modelo FTLA 2000 - A ABB, com janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} . Utilizou-se o bioproduto (surfactina) obtido semi-purificado por extração líquido-líquido e seco posteriormente, encontrando-se em forma de pó.

A análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho do surfactante produzido por produzido por *Bacillus subtilis* ICA 56 foi realizada em um equipamento Jasco – FTIR/6200, Acumulação: 100 scans; Resolução: 2 cm^{-1} ; Janela espectral: 400 a 4000 cm^{-1} ; Detector: TGS (triglycine sulfato). Foram feitas pastilhas brometo de potássio com o biossurfactante liofilizado para realização da análise. Analisou-se o biossurfactante produzido por ICA56 e a surfactina padrão (Sigma Aldrich).

4.8.2. Espectrometria de Massa do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ICA 56

As análises foram realizadas em um cromatógrafo UPLC Waters Acquity H-Class, acoplado com uma coluna Waters UPLC BEH C-18 100 nm, operando a 40 °C. O volume de injeção foi de 3,0 microlitros. A fase móvel A utilizada foi água com 0,1% peso de fórmico e a fase móvel B, acetonitrila com 0,1% peso fórmico com uma caudal de 0,5 mL/min com 20% V da fase A e 80% da fase B. O espectrofotômetro de massa é Waters Xevo-T9S. As condições de trabalho foram: “Polarity ES+, Capillary (kV) 3, Source Temperature 150 °C, Desolvation Temperature 500 °C, Desolvation gas flow 800 L/h”. O modo de trabalho foi o SIR (Selected ion recording), ou seja, o espectro de massa detecta somente moléculas com massa molecular indicada. As massas moleculares foram: 982,60, 994,60, 1008,60, 1022,60, 1036,60, 1050,60 e 1064,60, correspondentes aos identificados na surfactina padrão (Sigma Aldrich).

4.9. Estimativa de parâmetros para avaliação da produção de biossurfactantes pelas linhagens de *Bacillus sp.* estudadas

Para uma melhor interpretação do processo de produção de biossurfactantes pelas linhagens estudadas, alguns parâmetros importantes em bioprocessos foram calculados.

Calculou-se a conversão de substrato de acordo com Fogler (1992), conforme Equação 4.3:

$$\Delta S (\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

Sendo:

S_0 a concentração inicial do substrato e S a concentração de substrato nas amostras colhidas para análise em cada intervalo de tempo.

A produtividade volumétrica (P_P e P_X) foi calculada como a proporção de biotensoativo máximo (P_{\max} , mg/L) ou a concentração de células (X_{\max} , g/L) para o tempo de fermentação quando a concentração máxima foi obtida ($t_{P_{\max}}$ or $t_{X_{\max}}$, respectivamente, h):

$$P_P = \frac{P_{\max}}{t_{P_{\max}}} \quad \text{Equação 4.4}$$

$$P_X = \frac{X_{\max}}{t_{X_{\max}}} \quad \text{Equação 4.5}$$

O rendimento de biotensoativo em células ($Y_{P/X}$, g/g) foi definido como:

$$Y_{P/X} = \frac{(P_f - P_0)}{(X_f - X_0)} \quad \text{Equação 4.6}$$

Sendo P_0 e X_0 a concentração inicial do produto e das células e P_f e X_f o produto e a concentração de células em amostras a cada intervalo de tempo analisado.

O rendimento do substrato em células ($Y_{X/S}$, g/g) foi definido como:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_f - S_0)} \quad \text{Equação 4.7}$$

Sendo X_0 e S_0 a concentração inicial de células e do substrato e X_f e S_f a concentração de células e do substrato em amostras a cada intervalo de tempo analisado.

O rendimento de biotensoativo em células ($Y_{P/S}$, mg/g) foi definido como:

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_f - S_0)} \quad \text{Equação 4.8}$$

Sendo P_0 e S_0 a concentração inicial de produto e do substrato e P_f e S_f a concentração de células e do substrato em amostras a cada intervalo de tempo analisado.

4.10. *Bacillus subtilis* ICA56: Inibição do crescimento do micro-organismo produtor de biossurfactantes em placas contendo diferentes contaminantes

Para a realização deste teste, utilizou-se placas Petri contendo meio nutritivo (APGE) e com poços perfurados contendo diferentes tipos de contaminantes (1 – Óleo de motor usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20 p/p); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo Arabia leve (“Arabian light”) oriundos de Cepsa Química, Espanha. As placas foram inoculadas com o micro-organismo ICA56, em seguida, aplicou-se os contaminantes ($\pm 600 \mu\text{L}$) nos poços perfurados na placa e incubou-se em estufa a 30 °C. Verificou-se o crescimento após 24 e 48 horas para avaliar se os produtos aplicados impediriam o crescimento do micro-organismo.

4.11. Degradação de contaminantes em placa por *Bacillus subtilis* ICA56

Após os testes de inibição, verificou-se o potencial do micro-organismo ICA56 em degradar os contaminantes anteriormente citados (Tópico 4.10). O ensaio consiste em pesar 10 g de areia de mar lavada marca PANREAC ((pH: 6,4; porosidade: 0,47; densidade: 2,65 g/cm³, 25 °C; Tamanho de partícula: 0,25 – 0,30 mm) e impregná-la com 1% do contaminante, adicionando a seguir 1% de inóculo bacteriano. Para os ensaios de degradação

com petróleo, variou-se também as concentrações aplicadas do mesmo, sendo as proporções de areia/petróleo/inóculo 10:1:1; 10:2:1 e 10:3:1. Para os outros produtos as proporções foram areia/óleo de motor usado/inóculo (10:1:1), areia/mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20 p/p)/inóculo (10:1:1), areia/mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20 p/p)/inóculo (10:1:1). Para este teste, utilizou-se a metodologia de Bueno e colaboradores (2010) com modificações. A degradação foi acompanhada mediante análise macroscópica de 0 a 15 dias para comparar a evolução da degradação.

4.12. Biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ICA 56: características, propriedades e aplicações

4.12.1. Determinação da Tensão Superficial e da Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ICA 56

A tensão superficial (TS) das soluções de biossurfactante (BS) foi determinada mediante o método da placa Wilhelmy (tensiômetro Kruss K11) a 25 °C, 45 °C e 65 °C. Preparou-se uma solução de biossurfactante de concentração conhecida (10,0 g/L), dissolvendo-se o bioproducto liofilizado (sem qualquer purificação adicional além da precipitação ácida em pH 2,0 para recuperação do bioproducto) em água ultra pura (MilliQ) pH 8,0 ajustado com soluções de NaOH (3M) e/ou HCl (3M), conforme necessário. A solução deve ficar com pH entre 7,5 e 8,0 para completa dissolução do bioproducto. A partir da solução prepararam-se outras soluções com diferentes concentrações de BS para realização da análise (0,001 a 0,06 g/L nas temperaturas de 25 °C e 45 °C e de 0,001 a 0,5 g/L a 65 °C). As medidas de TS foram realizadas no mínimo três vezes, obtendo-se os valores médios e desvio-padrão. Os valores de concentração micelar crítica (CMC) do BS foram determinadas graficando-se os valores de tensão superficial obtidos experimentalmente frente ao logaritmo da concentração do biossurfactante.

4.12.2. Tensão Interfacial e Ângulo de Contato de soluções aquosas do biossurfactante produzido por ICA 56

A tensão interfacial (IFT) do sistema solução aquosa de biossurfactante/óleo lubrificante foi determinada a 25, 45 e 65 °C, usando diferentes concentrações de surfactante (10, 20 e 60 mg/L). Para avaliação do ângulo de contato, utilizou-se lamínulas revestidas com Parafilm© (Brand GMBH, Wertheim) como superfície para a gota na análise do ângulo de contato. Os valores de ângulo de contato (CA) entre as soluções biossurfactante e o Parafilm© (Brand GMBH, Wertheim) foram determinadas a 25 °C. Todas as medidas foram realizadas em triplicata através da técnica de gota séssil (VAN OSS *et al.*, 1988), empregando para tal um tensiômetro de gota (KSV K100, de KSV, Finlândia). Para a determinação da tensão interfacial, ajustou-se o perfil da gota formada mediante a Equação de Young-Laplace (SHAW, 1992). A determinação do ângulo de contato é realizada traçando-se a tangente ao perfil da gota obtida a partir de análise da imagem. Ambos os cálculos são realizados automaticamente mediante emprego do software específico proporcionado pelo próprio fabricante do equipamento utilizado, tensiômetro de gota (KSV K100, de KSV, Finlândia). Ensaios de controle foram realizados utilizando água ultra pura (milliQ).

4.12.3. Estabilidade de emulsão formada utilizando solução de biossurfactante e dodecano

Os ensaios para avaliação da estabilidade da emulsão formada empregando soluções com diferentes concentrações do biossurfactante (0,1, 0,5 e 1,0 mg/L) produzido por ICA 56 foram acompanhados durante 14 dias, segundo metodologia de Cooper e Goldeberg (1987), com modificações. Basicamente, o teste consiste na realização das seguintes etapas: (a) transferir a um tubo de ensaio 2 ml da solução de biossurfactante e 2 ml de dodecano; (b) agitar o tubo de ensaio usando vórtex (velocidade máxima) durante 2 minutos; (c) deixar os tubos em repouso a temperatura controlada (25 °C) e, (d) com auxílio de uma régua milimetrada, medir a altura total de líquido no interior do tubo de ensaio, assim como a altura da emulsão formada. Para determinar o índice de emulsificação utiliza-se a Equação 4.2

(descrita no item 4.7.2). Os valores de índice de emulsificação foram determinados ao longo do tempo. No primeiro dia as emulsões foram medidas com maior frequência (0, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h e 8h, 24 h) e posteriormente a intervalos de tempo maiores: 48, 72, 96, 120, 192, 264 e 336 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.12.4. Estabilidade do biossurfactante produzido frente à temperatura, pH e Força Iônica

O efeito da temperatura, do pH e da força iônica (mediante variação da concentração de NaCl) sob a estabilidade do biossurfactante foi avaliado mediante medidas de tensão superficial das soluções de biossurfactante utilizando um tensiômetro Kruss K11 pelo método da placa Wilhelmy a diferentes tempos: 01h, 24h, 48h e 72h. Preparou-se uma solução concentrada de biossurfactante (10,0 g/L) a partir da diluição do bioproduto (recuperado por precipitação ácida (pH 2,0), centrifugado, concentrado e liofilizado, em água ultra pura (MilliQ) e pH ajustado para uma faixa entre 7,5 - 8,0. A partir desta preparou-se as demais soluções na concentração de 20,0 mg/L para a realização dos testes. Em todos os experimentos, utilizou-se a solução de BS com concentração correspondente à concentração micelar crítica (CMC) a 25 °C (\approx 20,0 mg/L). A Tabela 6 apresenta as variáveis que foram estudadas para avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 frente a temperatura, pH e concentração de sal.

Tabela 6 - Variáveis estudadas nos ensaios de estabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56.

VARIÁVEL EM ESTUDO	VALORES
Temperatura (°C)	25 °C, 45 °C e 65 °C (por 72 h) 120 °C por 60 minutos (autoclave)
pH	2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12
Concentração de NaCl (g/L)	10, 20, 30, 40 e 50

4.12.5. Avaliação do poder de remoção (%) de óleo lubrificante adsorvido em areia utilizando o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ICA 56

A metodologia utilizada para avaliar o potencial de aplicabilidade do BS à remediação de solos contaminados encontra-se descrita no trabalho publicado por Moya-Ramírez e colaboradores (2014). Sucintamente, o método requer a realização de 4 etapas: (1) adição do corante Sudan III ao óleo lubrificante; (2) contaminação da areia com o óleo lubrificante preparado na etapa 1; (3) desenvolvimento do processo de lavagem da areia contaminada em condições experimentais controladas; (4) etapa final de quantificação da porcentagem de remoção do contaminante. Em cada teste experimental foram utilizados 10 g de areia de mar lavada marca PANREAC (pH: 6,4; porosidade: 0,47; densidade: 2,65 g/cm³, 25 °C; Tamanho de partícula: 0,25 – 0,30 mm) previamente contaminada artificialmente com óleo lubrificante em uma proporção 5:1 m/m. A areia contaminada foi depositada em uma coluna de vidro termostática de 8,5 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro interno (Figura 4.1). Um vidro poroso foi colocado no fundo da coluna para impedir a eluição do solo. A solução de lavagem (0,5 L) contida no interior do tanque encamisado foi bombeada para a coluna com um caudal descendente de 20,0 L/h. No final do processo, quando a coluna estava livre da solução de limpeza, tomaram-se três amostras da areia lavada (de 1,0 g, aproximadamente) e secou-se em estufa a 65 °C durante 24 h. Após esse período realizaram-se diluições com iso-octano da areia lavada e seca e mediu-se a absorbância a 300 nm (Espectrofotômetro Cary Bio 100), a fim de calcular a quantidade de óleo lubrificante residual aderido à areia ao final de cada experimento. A eficiência da remoção do contaminante (%) utilizando solução de biossurfactante produzido por ICA56 em ensaios de remediação de solos contaminados com óleo lubrificante foi determinada comparando-se a quantidade de óleo lubrificante aderido a areia ao final do ensaio com relação a quantidade existente inicialmente, de acordo com a Equação 4.9:

$$DE (\%) = \frac{(O_i - O_f)}{O_i} \times 100 \quad \text{Equação 4.9}$$

Sendo O_i é a massa inicial de óleo lubrificante presente na areia e O_f é a massa de óleo residual ao final do processo de lavagem.

A Figura 3 é um modelo representativo do sistema utilizado para realização do ensaio de remediação em solos contaminados com óleo lubrificante utilizando o biossurfactante produzido pelo micro-organismo ICA56.

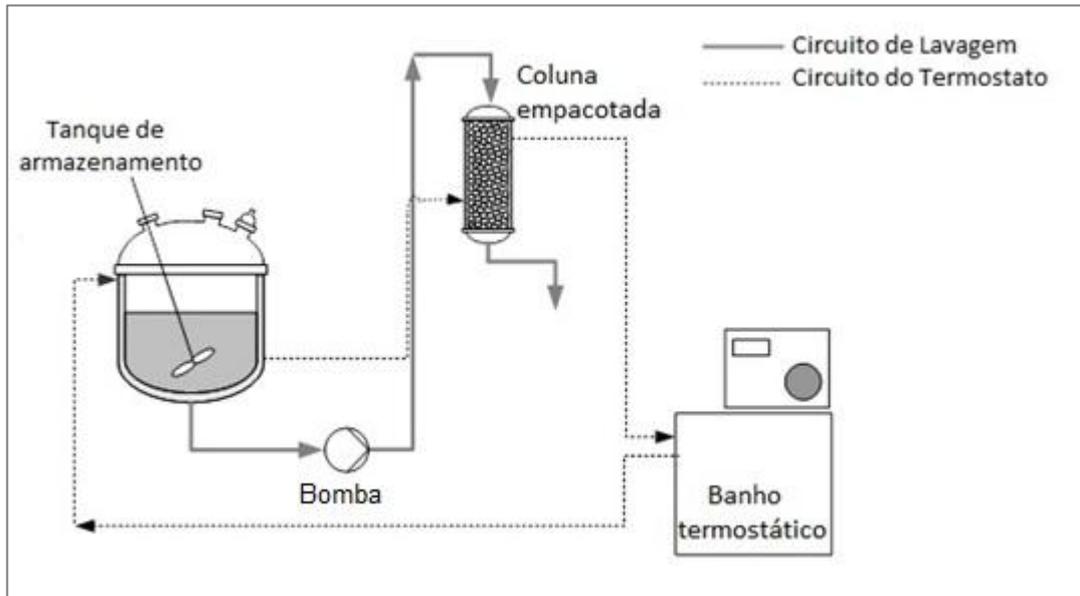


Figura 3 - Esquema do dispositivo experimental utilizado para os ensaios de remediação. Fonte: Moya-Ramírez et al., (2014).

Os valores de absorvância das amostras são então comparados com uma curva de calibração que relaciona concentração do óleo lubrificante e absorvância.

Para construção da curva de calibração, foram realizadas as seguintes etapas:

- Adicionou-se Sudan III ao óleo numa proporção de 0,064% m/m, agitando sob leve aquecimento por 30 minutos para completa dissolução do corante; Posteriormente filtrou-se para eliminar resíduos do corante não dissolvido;
- Fez-se uma reta padrão do óleo contendo coloração diluindo com isoctano iniciando com uma solução de 8,0 g/L. A absorvância foi medida a 300 nm;
- A partir da reta padrão obtida é possível calcular a concentração do óleo que foi removido da areia;
- Para contaminar a areia utilizou-se a proporção areia/óleo 50/10 m/m;
- Pesou-se um filtro de papel e um funil limpos para colocar a areia contaminada com óleo a fim de eliminar o óleo excedente, com um Becker abaixo do sistema deixando filtrar por 48 horas;
- Após este período, retirou-se toda a areia possível e pesou-se o filtro e o funil juntos.

Com essas informações calcula-se % em peso de óleo que tem na areia com a Equação 4.10 que segue:

$$A_i = \frac{Mac - a_e - a_r}{Mar + Mac - a_e - a_r} \times 100 \quad \text{Equação 4.10}$$

Sendo:

- Mac e Mar são as massas, em g, de óleo e areia utilizados para o ensaio;
- a_e é a quantidade de óleo que escorre ao deixar em repouso no funil com o papel filtro, que a temperatura ambiente será zero, pois as concentrações usadas se misturam bem e o óleo não escorre;
- a_r é a quantidade de óleo retida no filtro e no funil, obtida pela diferenças de pesos.

Para o planejamento dos ensaios de remediação a realizar recorreu-se a metodologia de planejamento estatístico de experimentos (Montgomery, 2008). O efeito da concentração de biosurfactante (C: 0, 10, 20 e 60 mg/L) e da temperatura (T: 25, 45 e 65°C) sobre a eficiência do processo de remoção do contaminante foi avaliado mediante planejamento fatorial. A Tabela 7 mostra a matriz de experimentos utilizada neste estudo, que consta de um total de 15 ensaios. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória, seguindo-se a referida metodologia, visando evitar a propagação de erros.

Tabela 7 – Condições experimentais empregadas nos testes de remediação.

Número do experimento	Concentração de BS (C, mg/L)	Temperatura (T, °C)
1	0	25
2	10	25
3	20	25
4	60	25
5	0	45
6	10	45
7	20	45
8	60	45
9	0	65
10	10	65
11	20	65
12	60	65
13	0	25
14	0	25
15	0	25

Os resultados experimentais de eficiência de remoção foram ajustados a um modelo linear que inclui o termo de interação entre variáveis:

$$De (\%) = a + b \cdot C + c \cdot T + d \cdot C \cdot T \quad \text{Equação 4.11}$$

Sendo:

a corresponde ao termo independente;

b, c e d são os parâmetros de ajuste do modelo;

C corresponde a concentração do biosurfactante (g/L);

T, a temperatura (°C) em que os ensaios foram realizados.

A validade do ajuste ao modelo matemático escolhido, assim como a análise do efeito de cada um dos fatores estudados sobre a eficiência de remoção, foi realizada mediante ANOVA. Adicionalmente, realizou-se o teste de “lack-of-fit”, assim como análise do gráfico de resíduos (Montgomery, 2008). O ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático escolhido, assim como a análise estatística dos dados, foi realizado mediante o uso do software Modde 6.0 (Umetrics UB, Umea, Suécia).

4.13. Ensaios de Biodegradabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ICA 56

Realizaram-se dois ensaios distintos para avaliar a biodegradabilidade do biosurfactante produzido: (a) primeiramente avaliou-se a capacidade de degradação do biosurfactante por parte do micro-organismo *Pseudomonas putida* CECT 324, adquiridas da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (Valência, Espanha). As bactérias foram adquiridas na forma liofilizada. Este teste tem duração de 72 horas; (b) Posteriormente, realizou-se o ensaio denominado método estático, com duração de 28 dias, seguindo a Norma UNE 55-844-91, aplicada para avaliação da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos e não iônicos comerciais empregados na formulação de detergentes.

4.13.1. Ensaios de biodegradabilidade utilizando *Pseudomonas putida*

O primeiro foi realizado utilizando o micro-organismo *Pseudomonas putida*, um gênero de bactéria. A bactéria *Pseudomonas putida* CECT324, gram-negativa em forma de bastonete foi adquirida da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (Valência, Espanha). Esta cultura foi reativada em placas de Petri composto por 1,0 g/L de extrato de carne, 2,0 g/L de extrato de levedura, 5,0 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar com pH 7.2. No cultivo estão presentes duas fontes de carbono, a proveniente do biotensoativo ensaiado e a fonte de carbono biodegradável do meio criogênico que está presente no estoque bacteriano.

A metodologia adotada nos testes de biodegradabilidade com *Pseudomonas putida* encontra-se descritas no trabalho de Lechuga e colaboradores (2012), seguindo a Norma UNE-EN ISO 10712:1996. Basicamente, o teste consiste nos seguintes passos: (a) repicar placas (inoculação) com o micro-organismo; (b) incubar as placas a 30 °C por 24 horas; (c) transferir as colônias para um meio nutritivo que será descrito a seguir; (d) incubar a 30 °C o erlenmeyer de capacidade de 50 mL contendo 20,0 mL contendo meio de cultivo e as colônias que foram transferidas, por 24 horas; (e) após trancorridas 24 horas, inocular (utilizando 200 µL de inóculo de *P. putida*) cada erlenmeyer de capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo contendo concentrações conhecidas de biotensoativo a ser ensaiado e incubar por 72 horas, 30 °C em banho termostaticado com agitação (100 rpm) para manter a temperatura constante e evitar a adesão de bactérias as paredes dos erlenmeyers. A quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) foi avaliada no início e final do experimento (0 e 72h) a fim de verificar a biodegradabilidade do biotensoativo mediante análise em TOC (Analisador de Carbono Orgânico Total, TOC-VCSH, Shimadzu). A eficiência da biodegradação do biotensoativo foi calculada pelo emprego da Equação 4.12 (CARA, 2012):

$$E_f = \frac{COD_i - (COD_f - COD_m)}{COD_i} \times 100 \quad \text{Equação 4.12}$$

Sendo:

COD_i é o carbono orgânico dissolvido no meio líquido no início do cultivo;

COD_f é o carbono orgânico dissolvido no meio líquido no final do ensaio;

COD_m é a concentração mínima de carbono orgânico que não pode ser metabolizada pelas células (este valor é obtido com as amostras do branco, na ausência do tensoativo).

Para compor o meio de cultivo (solução nutriente), foram preparadas duas soluções, uma de compostos inorgânicos e outra de elementos traço, esterilizadas a 121 °C por 10 minutos.

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados em duplicata, em erlenmeyers de 250 mL, com volume final de 100 mL, adicionando-se aos erlenmeyers:

- 50 mL do meio de compostos inorgânicos (Tabela 8);
- 1,0 mL de solução de elementos traço (Tabela 8);
- volume de solução de biotensioativo necessária para conseguir a concentração desejada em 100 mL;
- água ultra pura (MilliQ) até completar o volume de 100 mL;

Tabela 8 - Composição do inoculo, meio de compostos inorgânicos e elementos-traço.

Inóculo:	Meio de compostos inorgânicos:	Elementos traço:
1,0 g/L de extrato de carne;	1,0 g/L de NH ₄ Cl;	0,98 g/L de CaCl ₂ .2H ₂ O;
2,0 g/L de extrato de levedura;	1,0 g/L de K ₂ HPO ₄ ;	1,0 g/L de MnSO ₄ .H ₂ O;
5,0 g/L de peptona;	1,0 g/L de KH ₂ PO ₄ ;	0,8 g/L de
5,0 g/L de NaCl;	1,0 g/L de MgSO ₄ .7H ₂ O	Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ .7H ₂ O;
15,0 g/L de ágar* (quando meio sólido).		0,2 g/L de ácido nitrilotriacético

*(quando meio sólido); Fonte: Lechuga *et al.* (2012); Norma UNE-EN ISO 10712:1996.

Uma vez completada a preparação do meio de cultivo, ajustou-se o pH a 7,0 mediante adição de NaOH 1,0 M. A continuação, inoculou-se cada erlenmeyer com 200 µL de meio de cultivo previamente preparado com *P. putida*, incubado em agitador rotatório a 130 rpm), 30 °C por 24 horas. Por último, incubaram-se os meios de cultivo inoculados em agitador rotatório com banho termostaticado a 130 rpm, 30 °C, por 72 horas em ambiente escuro.

4.13.2. Ensaio de biodegradabilidade utilizando o Método Estático

O ensaio de biodegradabilidade foi realizado mediante especificações da Norma UNE 55-844-91 (denominado “método estático”) que consiste em inocular uma pequena quantidade de micro-organismos aeróbios, procedentes de uma população mixta e aerada, em um meio aquoso nutritivo de composição química definida apto para o crescimento microbiano (CARA, 2012; RUIZ, 2010). O inóculo utilizado foi obtido na estação de tratamento de águas residuais urbanas “UTE EDAR GRANADA SUR” (Granada, Espanha).

Para compor o meio de cultivo (solução nutriente), foram preparadas quatro soluções distintas, esterilizadas a 121 °C por 15 minutos. O meio de cultivo é preparado adicionando 0,1% das soluções A, B, C e D em água destilada. Nesse meio aquoso adicionaram-se diferentes concentrações conhecidas do biotensativo a avaliar, considerando-se o volume a ser ensaiado. Utilizou-se erlenmeyers de 2,0 L de capacidade, contendo 1,2 L de meio de cultivo contendo biotensativo em sua composição. Adicionou-se aos meios, 0,5 ml de inóculo e incubou-se a 25 °C ± 1 °C, com uma agitação de 125 rpm em ambiente escuro. Na Tabela 9 descreve-se a composição das soluções utilizadas para preparação dos meios de cultivo para realização dos ensaios de biodegradabilidade.

Tabela 9 - Composição das soluções A, B, C e D empregadas na preparação dos meios de cultivo para realização dos ensaios de biodegradabilidade.

Solução	Composição
Solução A	8,5 g/L de KH ₂ PO ₄
	21,75 g/L de K ₂ HPO ₄
	33,4 g/L de Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O
	1,70 g/L de NH ₄ Cl
Solução B	22,50 g/L de MgSO ₄ .7H ₂ O
Solução C	27,5 g/L de CaCl ₂
Solução D	0,25 g/L de FeCl ₃ .6H ₂ O

Fonte: Norma UNE 55-844-91

Analisou-se o consumo de carbono orgânico dissolvido (COD) ao longo do experimento a fim de avaliar a biodegradabilidade. O método tem duração de 28 dias, de acordo com a norma utilizada. As concentrações de biotensativo estudadas foram: 0 (Branco), 10, 25, 50, 100 e 200 mg/L. Retirava-se uma alíquota de ± 25 ml para a análise da concentração carbono orgânico dissolvido (COD), em TOC nos tempos correspondentes a: 0h, 7h, 24h (1 dia), 31h, 48 h (2 dias), 72h (3 dias), 96h (4 dias), 168h (7 dias), 216h (9dias),

288h (12 dias), 336h(14 dias), 408h (17 dias), 528h (22 dias), 600h (25 dias) e 672h (28 dias). Calculou-se a porcentagem de carbono orgânico dissolvido residual (% COD Residual) de acordo com a Equação 4.13, a porcentagem de biodegradação final (% Biodegradação Final) através da Equação 4.14 e a porcentagem de eficiência da biodegradação, mediante o emprego da Equação 4.15.

$$\text{Residual} = \frac{[\text{COD}]_t}{[\text{COD}]_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 4.13}$$

$$\% \text{Biodegradação Final} = \frac{[\text{COD}]_0 - [\text{COD}]_t}{[\text{COD}]_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 4.14}$$

$$\% \text{Eficiência da Biodegradação} = \frac{([\text{COD}]_0 + [\text{COD}]_{\text{Branco}}) - [\text{COD}]_t}{[\text{COD}]_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 4.15}$$

Sendo:

COD_t – Concentração de carbono orgânico dissolvido no meio líquido em um instante “t”;

$\text{COD}_{\text{Branco}}$ – Concentração de carbono orgânico dissolvido no meio líquido livre de biotensoativo (Branco);

COD_0 – Concentração de carbono orgânico dissolvido no meio líquido no início do ensaio.

4.14. Toxicidade em organismos aquáticos

A toxicidade do biossurfactante produzido foi estudada mediante três métodos distintos, realizando-se testes com a microalga *Selenastrum Capricornutum*, com o microcrustáceo *Daphnia magna* e com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. Os procedimentos foram descritos conforme normativas, protocolos dos kits e baseado nos trabalhos de Cara (2012) e Ruiz (2010).

4.14.1. Toxicidade do biossurfactante em microalga (*Selenastrum Capricornutum*)

Os testes de toxicidade com microalga foram realizados conforme a Norma UNE-EN ISO 8692:2012 (ISO 8692:2012). O método baseia-se na inibição do crescimento de algas de água doce, da espécie *Selenastrum capricornutum*. Utilizou-se o Kit ALGALTOXKIT FTM, de acordo com a Norma ISO 8692 e com OECD Guideline 201 (OECD, 1984a). O teste baseia-se na medida da densidade óptica (OD) a 670 nm de um meio líquido nutritivo com composição similar a água doce adicionado de uma suspensão de algas e diferentes concentrações do biossurfactante. Os resultados são comparados com os obtidos utilizando uma solução em que o biossurfactante não está presente, o branco. As medidas de densidade óptica podem ser convertidas em termos de concentração de algas utilizando uma reta padrão que faz parte do kit, bem como as soluções para preparar a água doce. Todas as instruções para preparo de amostras, conservação, análise e interpretação dos dados podem ser encontrados no manual do kit ALGALTOXKIT FTM (Microbiotests inc. Mariakerke (Gent - Bélgica) bem como na Norma UNE-EN ISO 8692:2012 (ISO 8692:2012).

A taxa de crescimento da microalga (*Selenastrum Capricornutum*) para cada concentração de biotensioativo avaliada foi determinada a partir da pendente obtida a partir da representação do logaritmo da densidade ótica (Log OD) frente ao tempo. A taxa de crescimento (μ) avalia-se mediante a Equação 4.16:

$$\mu(Cx) = \frac{\log OD_{72 \text{ horas}} - \log OD_{0 \text{ horas}}}{72 \text{ horas}} \quad \text{Equação 4.16}$$

Sendo:

$\log OD_{72 \text{ horas}}$ é logaritmo da medida de absorbância a 670 nm no tempo de 72 horas;

$\log OD_{0 \text{ horas}}$ é logaritmo da medida de absorbância a 670 nm no início do experimento.

Com a taxa de crescimento para cada concentração (μ_{cx}) e para o controle (μ_{co}) pode-se avaliar a taxa de inibição (γ), para cada concentração com a Equação 4.17:

$$\% \gamma(Cx) = \frac{\mu_{co} - \mu_{cx}}{\mu_{co}} \cdot 100 \quad \text{Equação 4.17}$$

O valor de toxicidade expressa-se como IC₅₀, que corresponde a concentração de um determinado agente de poder tóxico em mg/L que produz inibição de 50% no crescimento depois de 72 horas em exposição a essa substância. Representa-se o logaritmo da concentração da substância teste em função da taxa de inibição em %. Na representação dos dados, pode-se ajustar uma linha reta mediante o método dos mínimos quadrados, avaliando, obtendo-se a Equação 4.18:

$$\text{Log[biotensotivo]} = A. \% \gamma + B \quad \text{Equação 4.18}$$

Avaliando para 50% a taxa de inibição, obtém-se o valor para IC₅₀.

4.14.2. Toxicidade do biossurfactante ao microcrustáceo *Daphnia magna*

A análise de toxicidade com *Daphnia magna* foi realizada conforme a Norma UNE-EN ISO 6341:1996 (UNE EN ISO 6341:1996) e com OECD Guideline 202 (OECD, 1984b). Utilizou-se para os testes o Kit DAPHTOXKIT FTM magna, onde o micro-organismo de prova é um microcrustáceo, *Daphnia magna* Straus (*Clodocera*, *Crustacea*). A medida se baseia na morte ou imobilização dos microcrustáceos como consequência do efeito tóxico do produto testado após 24 horas de exposição, neste caso, o biossurfactante produzido. Para fins de comparação, os mesmos ensaios foram realizados com a saponina, um tensoativo comercial.

Utilizou-se placas com múltiplos (pertencentes ao kit, 6 filas, com 5 poços cada), adicionou-se 10 ml de solução de biotensotivo preparadas com água doce nas concentrações a serem testadas. Transferiu-se 20 neonatos para o primeiro poço da placa (lavado) e a partir desse transfere-se cinco neonatos para os demais poços, evitando assim a diluição da solução a ser testada no momento da transferência. Cobriu-se a placa com Parafilm© colocando sua tampa em seguida, mantendo em incubação a 20 °C, em escuridão, durante 24 horas para primeira contagem dos organismos imobilizados. A contagem foi repetida com 48 horas de experimento. Consideram-se organismos imobilizados os neonatos que não são capazes de nadar depois de uma suave agitação do líquido por 15 segundos, inclusive se não podem mover suas antenas.

Somando o número de imobilizados e dividindo pelo número total de organismos testados para cada concentração (utilizou-se 20 neonatos) obtém-se a % do efeito, de acordo com a Equação 4.19:

$$\%Efeito = \frac{N^{\circ} \text{ imobilizados}}{20} \quad \text{Equação 4.19}$$

O valor da toxicidade se mede como IC₅₀, que é a concentração do agente testado em mg/L capaz de produzir imobilização de 50% da população depois de 24 horas de exposição ao tóxico. O cálculo se realiza representando o logaritmo da concentração do agente testado em função da porcentagem do efeito. Na representação dos dados pode-se ajustar uma linha reta mediante o método dos mínimos quadrados, de forma que com a Equação 4.20 pode-se calcular o valor para IC₅₀.

$$\log[tenoativo] = A. \%efeito + B \quad \text{Equação 4.20}$$

Avaliando para 50% a taxa de inibição se obtém os valores de EC₅₀.

4.14.3. Toxicidade do biossurfactante em bactérias marinhas luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177

Os ensaios de toxicidade realizados com bactérias marinhas luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 de DrLANGE como micro-organismo bioindicador (sistema de medição em LUMIStox 300, DrLANGE), seguiram a Norma UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2:2007). A medida de toxicidade neste ensaio baseia-se na inibição da intensidade luminosa da bactéria marinha depois de um determinado tempo de exposição com a substância a ser avaliada a intensidade tóxica e um controle não tóxico. Todos os procedimentos para realização do teste estão descritos na Norma UNE-EN ISO 11348-2 bem como no kit da bactéria *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 para realização do ensaio. Para análise dos resultados, as equações descritas a seguir são necessárias.

Os valores iniciais de intensidade luminosa medida para todas as amostras do ensaio são corrigidos mediante um fator que leva em conta a diminuição da intensidade

luminosa que se produz de forma natural, mesmo na ausência de amostra tóxica. A Equação 4.21 é utilizada para calcular a correção:

$$f_k = \frac{I_t(0)}{I_0(0)} \quad \text{Equação 4.21}$$

Sendo:

f_k - fator de correção para o tempo de incubação de 15 a 30 minutos;

$I_0(0)$ - intensidade luminosa em tempo zero, antes da adição de solução diluente (solução de NaCl 2% adicionada de agente tóxico);

$I_t(0)$ - intensidade luminosa após um período de incubação de 15 e 30 minutos;

O efeito inibitório da amostra ensaiada para um tempo de incubação "t", calcula-se utilizando a Equação 4.22:

$$H_t = \frac{I_{ot}(c) - I_t(c)}{I_{ot}(c)} \times 100 \quad \text{Equação 4.22}$$

Sendo:

$$I_{ot}(c) = \bar{f}_k \times I_0(c) \quad \text{Equação 4.23}$$

Sendo \bar{f}_k o fator de correção médio das amostras controle.

Para avaliação das relações concentração/efeito, calcula-se para cada nível de diluição a função Gama (Γ). Esta função é a razão entre a intensidade da luz perdida pela solução de bactérias e sua diminuição após expostas a ação da amostra tóxica, podendo ser avaliada pela Equação 4.24:

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{100 - \bar{H}_t} = \frac{f_k \cdot I_0(c) - I_t(c)}{I_t(c)} \quad \text{Equação 4.24}$$

Sendo:

$I_0(0)$ e $I_t(0)$ são as leituras de intensidade luminosa das cubetas de concentração zero a tempo zero e "t";

$I_0(c)$ e $I_t(c)$ são as leituras de intensidade luminosa das cubetas de concentração C a tempo zero e "t";

\bar{H}_t é a média de H_t .

A partir dos resultados obtidos deduz-se uma relação linear entre a função Γ e a concentração do tensoativo empregado, de acordo com a Equação 4.25:

$$\log(C) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a) \quad \text{Equação 4.25}$$

Sendo:

- $\log(C)$ é o logaritmo das concentrações de agente tóxico utilizada no ensaio;
- b é o valor da pendente da reta descrita;
- $\log(\Gamma)$ é o logaritmo dos valores calculados de Gama (Γ) no ensaio;
- $\log(a)$ é o valor da ordenada na origem da reta descrita.

O valor da toxicidade mede-se como EC_{50} e EC_{20} e são, respectivamente, a concentração de tensoativo em mg/L que produz uma inibição de 50% e de 20% depois de 15 ou 30 minutos de exposição ao tóxico. Os valores de EC_{50} e EC_{20} são calculados atribuindo a Γ os valores de 1,0 e 0,25 respectivamente.

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Seleção de micro-organismos para a produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos

5.1.1. Seleção de cepas e avaliação de meios de cultivo

Para se selecionar um micro-organismo com potencial de produção de biossurfactantes e avaliar a possibilidade de se utilizar um meio de cultivo mais barato, realizaram-se ensaios com as diferentes cepas realizando a amostragem nos tempos de 0h a 48 horas. O presente estudo objetivou o uso de suco de caju clarificado como fonte de carbono alternativa e de baixo custo e ensaios utilizando esse co-produto agroindustrial no meio de cultivo foram realizados. A Tabela 10 apresenta os resultados para concentração de surfactina obtidos nos ensaios realizados.

Tabela 10 - Resultados de concentração de surfactina obtidos para ensaios realizados com as cepas *B. subtilis* LAMI005, *Bacillus sp.* Jag 248, Jag 249, ICA 24 e *B. subtilis* ICA 56, por 48 h, 30 °C.

Meios de Cultivo	<i>B. subtilis</i> ^a LAMI005	Jag 248 ^b	Jag 249 ^b	ICA 24 ^b	ICA 56 ^b
MM + SM	15 mg/L (Giro <i>et al.</i> , 2009)	112,31 ± 3,68 mg/L	ND	111,87 ± 0,00 mg/L	141,80 ± 0,00 mg/L
CAJC+(NH ₄) ₂ SO ₄ (C ₁ = 20 g/LART)	20,02 ± 0,03 mg/L	18,42 ± 0,08 mg/L	ND	113,27 ± 0,00 mg/L	58,05 ± 0,00 mg/L

Nota: MM +SM (Meio mineral adicionado de solução de micronutrientes (Móran *et al.*, 2000); CCAJ +(NH₄)₂SO₄ (Suco de caju clarificado (Concentração inicial de 20 g/L de glicose e frutose (Açúcares Redutores Totais - ART) suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio; ND: não detectado. ^a 180 rpm; ^b 150 rpm.

Após avaliação dos diferentes micro-organismos e meios de cultivo, verificou-se que suco de caju clarificado não se apresentou como uma boa fonte carbono para a maioria linhagens testadas. Houve produção de biossurfactantes, porém as concentrações são, em geral, inferiores às obtidas utilizando meio mineral suplementado com solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono. Acredita-se que o fato da baixa produção de biossurfactantes ao utilizar o suco é devido a grande variedade de nutrientes

presentes, contribuindo para o aumento de biomassa, mas não favorecendo a excreção do metabólito de interesse. Verificou-se que o suco de caju clarificado dificultava a padronização do processo por ser oriundo de uma fruta sazonal onde cada safra apresenta distintas concentrações na sua composição nutricional, como por exemplo, as concentrações glicose e frutose, bem como as de proteínas, fósforo, ferro, magnésio, sódio, entre outros. A composição nutricional do suco de caju clarificado pode ser encontrada nos estudos de Rocha (2007).

Trabalhos anteriores (Giro *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009; FREITAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2013) do Grupo de Pesquisa e Processos Biotecnológicos (GPBio) da Universidade Federal do Ceará, mostraram que o *Bacillus subtilis* LAMI005 apresentava potencial para a produção de surfactina, pois obtiveram concentrações satisfatórias em seus trabalhos. Com isso esta cepa foi usada como controle na avaliação de outras linhagens de *Bacillus sp.*, no intuito de "inovar" as pesquisas realizadas pelo grupo. Assim, comparando-se os resultados mostrados na Tabela 5.1, para os dois meios avaliados verificou-se ainda que as concentrações apresentadas em trabalho anterior de Giro e colaboradores (2009) e no experimento realizado no presente estudo com *B. subtilis* LAMI005 são, na sua maioria, inferiores, reforçando a opção de não seguir investigações com essa cepa.

A Figura 4 (A, B, C e D) apresenta os resultados de tensão superficial, biomassa e consumo de substrato em função do tempo para os ensaios realizados utilizando as cepas *Bacillus sp.* Jag 248, Jag 249, ICA 24 e ICA 56. Observa-se na Figura 4 que as cepas avaliadas (exceto a Jag 249) consumiram a fonte de carbono utilizada, que se esgotou a partir de 20 horas de ensaio. Esse é um comportamento típico de um metabólito secundário, que não está associado ao crescimento. No que diz respeito ao crescimento celular, nota-se a máxima produção de biomassa entre 1,5 e 5,0 g/L (Figura 4: A, B, C e D). Houve também redução da tensão superficial (TS) para valores abaixo de 30 mN/m a partir de 08 horas, exceto quando se utilizou o *Bacillus sp.* Jag 249. Para este último micro-organismo, a não redução da TS indica que não houve produção de biossurfactante, portanto não foram realizadas as demais análises para os ensaios com essa cepa.

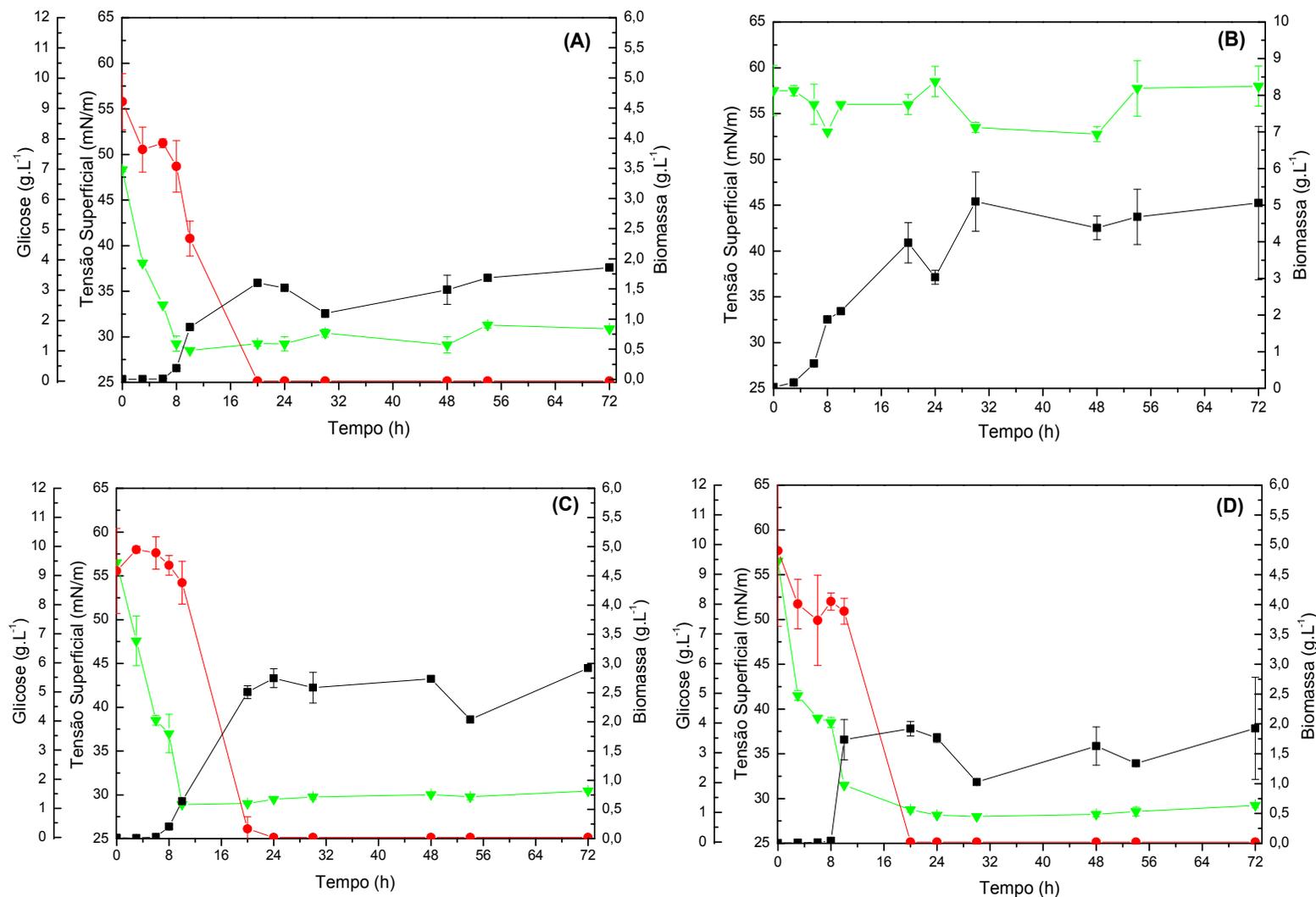


Figura 4 - Resultados obtidos para os ensaios realizados em meio mineral suplementado com solução de micronutrientes, por 72 h, 150 rpm, 30 °C. (▼) Tensão superficial, (●) Consumo de glicose e (■) Concentração de Biomassa. (A) *Bacillus* sp. Jag 248, (B) Jag 249, (C) ICA 24 e (D) ICA56.

Segundo Cooper e Paddock (1984) um organismo é considerado promissor produtor de biossurfactante quando produz compostos tensoativos capazes de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 40 mN/m. No entanto, para um biossurfactante ser considerado eficiente é necessário que este valor esteja abaixo de 35 mN/m (DA SILVA & ALVAREZ, 2002). Decesaro e colaboradores (2013) ao estudarem a produção de biossurfactantes por micro-organismos isolados de solo contaminado com óleo diesel, obtiveram valores de redução da tensão superficial para *Pseudomonas* de 20% e para *Bacillus* de 33% com tensão superficial final de 35,67 mN/m. Faria e colaboradores (2011) utilizando glicerol bruto oriundo do processo do biodiesel para produção e caracterização de surfactina por *Bacillus subtilis* LSFM-05, obtiveram em seus estudos tensão superficial de 29,5 mN/m após 36 h de fermentação, atingindo 32,1 mN/m após 72 h. Nitschke & Pastore (2006) obtiveram uma redução da tensão superficial de 37% em relação ao ponto inicial, inferior as obtidas pelos testes com o líquido metabólito de ICA 24 e ICA 56 aqui estudados.

Posteriormente, determinou-se a concentração de biossurfactante. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos de concentração de surfactina para *Bacillus sp.* Jag 248, ICA 24 e *B. subtilis* ICA 56.

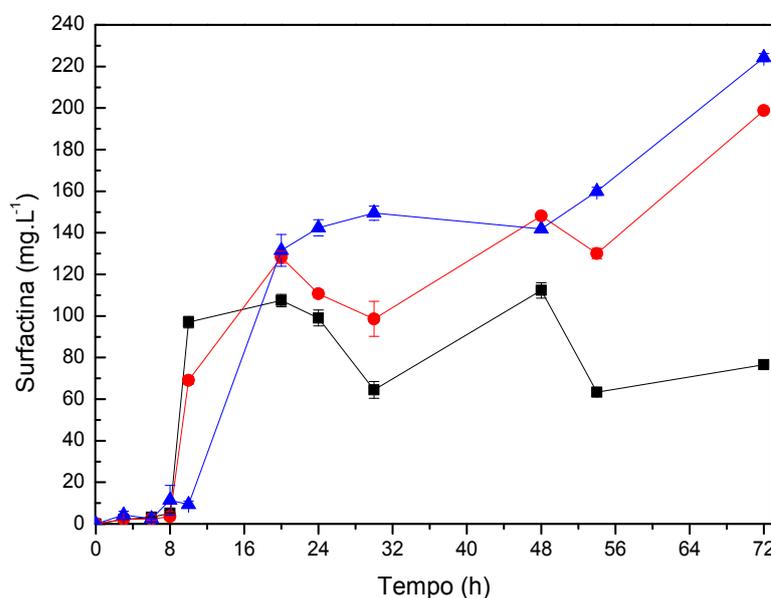


Figura 5 - Resultados obtidos de concentração de surfactina nos ensaios realizados em meio mineral suplementado com solução de micronutrientes, por 72 h, 150 rpm, 30 °C. (■) *Bacillus sp.* Jag 248, (●) ICA 24 e (▲) ICA 56.

Observa-se pela Figura 5, que a maior concentração de surfactante foi produzida pelos micro-organismos ICA 24 e ICA 56 e ocorreu no tempo de 72 horas, atingindo concentrações em torno de 200 mg/L e 230,0 mg/L, respectivamente. Para Jag 248, a maior

concentração foi obtida no tempo de 48 horas, em torno de 110,0 mg/L. O declínio na produção de surfactina por Jag 248 depois de 48 horas de ensaio pode ser explicado pelo consumo ou degradação da surfactina pelo próprio micro-organismo, pois este é capaz de produzir proteases e hidrolisar a molécula para suprir o metabolismo microbiano (NITSCHKE; PASTORE, 2004; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Liu e colaboradores (2012), ao realizarem estudo de otimização, obtiveram valor máximo de surfactina de 129 mg/L no tempo de 48 h de cultivo. Os valores apresentados pelos autores são inferiores aos produzidos por ICA 56 no presente estudo. Lima Júnior (2013) ao avaliar a obtenção de surfactina pelo micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, obteve concentrações de surfactina no tempo de 36 horas de $135 \pm 4,92$ mg/L e $131 \pm 1,87$ mg/L, quando utilizou cultivos em meio mineral e mineral modificado, respectivamente. No meio formulado de acordo com a composição centesimal do micro-organismo e produto, a produção de surfactina obtida pelo autor (Lima Júnior, 2013) atingiu a concentração de $66 \pm 1,07$ mg/L em 96 horas de ensaio, enquanto no meio contendo melaço de soja com 2% açúcares totais, obtiveram $136,00 \pm 9,28$ mg/L. Em contrapartida, Makkar e Cameotra (1997a) obtiveram cerca de 1,0 g/L de biossurfactante produzido por *B. subtilis* MTCC 2423, cultivado em meio mineral suplementado com melaço, porém a produção por *B. subtilis* MTCC 1427 foi cerca de 200,0 mg/L. Al-Bahry e colaboradores (2013) ao estudarem a utilização de melaço de tamareira (*Phoenix dactylifera. L.*) como única fonte de carbono e energia para a produção de biotensioativo por *Bacillus subtilis* B20, obtiveram concentrações de $2,29 \pm 0,38$ g/L.

Levisauskas e colaboradores (2004) relatam que a concentração de carbono, de nitrogênio e as fontes de nutrientes específicos para a taxa de crescimento celular são os fatores mais importantes que influenciam na biossíntese de biossurfactante.

Observou-se nos resultados para consumo de substrato que os micro-organismos estudados esgotaram a fonte de carbono com 20 horas de ensaio (ver Figura 4). Accorsini (2010) reporta que a glicose é uma fonte de carbono facilmente assimilável, responsável pelo rápido crescimento celular, sendo consumida rapidamente e que nos ensaios de biossíntese, geralmente a glicose é combinada com outras fontes de carbono para obtenção de melhores resultados. No presente estudo não houve adição de outra fonte de carbono combinada com glicose, no entanto, acredita-se que o nutriente que auxiliou na manutenção do micro-organismo para continuar excretando o biossurfactante foi o extrato de levedura, que atua como fonte de nitrogênio, exercendo importante papel na produção de biossurfactante. Casas e García-Ochoa (1999) para otimizarem o meio de produção, testaram diferentes

concentrações de extrato de levedura (1 a 20 g/L) e observaram que o uso de baixas concentrações de extrato de levedura (1,0 g/L) favorecem a produção de soforolipídeos por *Candida bombicola*. Os autores relatam que em altas concentrações de extrato de levedura, a produção de biossurfactante diminui devido à exaustão da fonte de carbono, causada pelo grande aumento da biomassa. No presente estudo, utilizou-se 5,0 g/L de extrato de levedura, e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L) como fonte de nitrogênio. De acordo com os resultados obtidos de concentração de surfactina, verificou-se que o esgotamento de glicose não estacionou a produção de biossurfactante pelas cepas estudadas.

As Tabelas 11, 12 e 13, apresentam os resultados de índice de emulsificação utilizando diferentes fontes hidrofóbicas - óleo de soja, querosene e n-hexadecano - para Jag 248, ICA 24 e ICA 56, respectivamente. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 11 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE₂₄) para o ensaio realizado utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono.

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE ₂₄)			
AMOSTRA	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	14,00 ± 2,83	05,77 ± 2,72	15,96 ± 5,71
48 h	19,10 ± 3,11	05,79 ± 3,13	26,00 ± 2,83
54 h	20,31 ± 5,95	12,44 ± 2,67	11,07 ± 6,23
72 h	22,63 ± 6,57	04,36 ± 0,00	25,90 ± 1,56

Observa-se pela Tabela 11, que o biossurfactante produzido pelo micro-organismo não foi eficaz na formação de uma emulsão que seja considerada satisfatória. Segundo a literatura, para que a emulsão seja considerada satisfatória, o IE₂₄ deve apresentar valor superior a 40% (YOUSSEF *et al.*, 2004). Com nenhuma das fontes hidrofóbicas testadas, obteve-se IE₂₄ de pelo menos 40%. O maior valor de IE₂₄ foi de 26,00 ± 2,83 utilizando n-hexadecano. Barreto (2011), ao estudar sobre prospecção ambiental de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes, avaliou a capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *Bacillus sp.* Jag248. Ao realizar um teste adicionando 300 µL do sobrenadante bruto da cultura em uma emulsão estável formada por meio mineral, querosene e Tween 80, um tensoativo comercial utilizado como controle positivo para ensaios de emulsificação, verificou ao longo de 30 dias de observação que a emulsão se desfez completamente, mostrando que o micro-organismo produziu um desemulsificante. Os testes

realizados no presente trabalho mostram que o biossurfactante produzido não é um bom emulsificante, e, conforme relata a literatura, nem todos os biossurfactantes são bioemulsificantes (RON & ROSENBERG, 2001; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Tabela 12 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE₂₄) para amostras do ensaio realizado para produção de biossurfactantes por ICA24 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono a 30 °C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Amostra	Óleo de Soja	Querosene	N-Hexadecano
30 h	33,12 ± 0,00	64,83 ± 0,97	64,83 ± 1,18
48 h	61,67 ± 2,36	59,36 ± 1,92	62,00 ± 2,83
54 h	62,00 ± 0,00	61,80 ± 5,81	62,83 ± 1,65
72 h	86,67 ± 9,43	61,01 ± 1,43	60,65 ± 1,44

Observou-se através dos resultados obtidos (Tabela 12) que o meio contendo surfactante foi capaz de emulsionar todas as fontes hidrofóbicas testadas com IE₂₄ predominantemente maior que 60%. Barros e colaboradores (2008), ao estudarem as propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira, obtiveram resultados semelhantes, com valores de índice de emulsão acima de 40% para a maioria das fontes testadas. Em tal estudo, o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) apresentou resultados melhores ($\geq 40\%$) ou bastante próximos do IE₂₄ do biossurfactante em todos os óleos analisados. Quando foram comparados os resultados de estabilidade de emulsão, o (SDS) apresentou os melhores resultados, seguido do biossurfactante (BS) produzido por *Bacillus sp.* e da lecitina de soja (LEC). Os resultados relatados na literatura são semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Tabela 13 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE₂₄) para amostras do ensaio realizado para produção de biossurfactantes por *B. subtilis* ICA56 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono a 30 °C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Amostra	Óleo de Soja	Querosene	N-Hexadecano
30 h	47,92 ± 22,31	61,48 ± 2,36	61,63 ± 3,35
48 h	62,54 ± 0,59	63,44 ± 0,42	63,30 ± 5,71
54 h	56,06 ± 11,19	54,47 ± 9,39	63,06 ± 0,13
72 h	62,40 ± 0,80	63,57 ± 0,95	54,40 ± 7,26

Observou-se na Tabela 13 que para todas as fontes hidrofóbicas testadas o índice de emulsificação foi acima de 50%, confirmando mais uma vez afirmações reportadas pela literatura, que emulsões obtidas acima de 40%, indicam que o micro-organismo é produtor de um bom bioemulsificante (YOUSSEF *et al.*, 2004).

A redução da tensão superficial, indicativo de produção de biossurfactante (NITSCHKE & PASTORE, 2002), ocorreu em todas as amostras analisadas, no entanto, emulsões acima de 50% só foram observadas para os ensaios com os micro-organismos ICA 24 e ICA 56, enquanto Jag 248 apresentou emulsões inferiores a 26% com todas as fontes hidrofóbicas testadas. Como nem todo biossurfactante constitui um bioemulsificante (RON & ROSENBERG, 2001), as duas propriedades estudadas, redução da tensão superficial como indicativo de produção e poder emulsificante, não apresentam obrigatoriamente correlação. Felix (2011) obtiveram resultados relevantes ao formular emulsões com diesel, querosene, gasolina, tolueno, n-hexadecano e heptano ao longo de 24 horas, utilizando o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005, relatando IE₂₄ de 67,5%, 66,1%, 55,2%, 65,1%, 68,6% e 62,6% para cada fonte testada, respectivamente. Bezerra e colaboradores (2012) utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato obtiveram índice de emulsificação variando de 50 a 68%, valores semelhantes aos obtidos no presente estudo com as cepas ICA 24 e ICA 56.

A Figura 6 apresenta o perfil de produtividade do biossurfactante obtido no processo fermentativo calculado a partir dos resultados encontrados nos ensaios realizados utilizando as cepas Jag 248, ICA 24 e ICA 56.

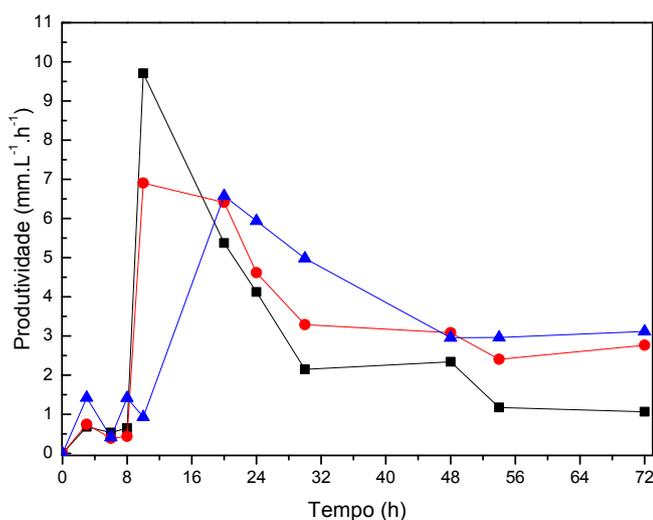


Figura 6 - Resultados obtidos de produtividade dos biossurfactantes produzidos nos ensaios realizados em meio mineral suplementado com solução de micronutrientes e glicose (10,0 g/L) como fonte de carbono, por 72 h, 150 rpm, 30 °C; (■) *Bacillus sp.* Jag 248, (●) ICA 24 e (▲) ICA 56.

Observa-se pela Figura 6 maior produtividade por Jag 248, seguido de ICA24 e ICA56. A título de comparação, em cultivos contendo soja a fim de fornecer 2% açúcares totais, Lima Júnior (2013) obteve produtividade em produto de $P_p = 3,79 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 36 horas de ensaio, resultado semelhante ao obtido no presente estudo. Segundo a literatura (NIELSEN & LIDÉN, 2002), a produtividade não é o único parâmetro a ser avaliado quando se desenha um bioprocessos. Outros parâmetros devem ser avaliados como P_{\max} , $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$, P_p para uma melhor interpretação do processo de produção.

A Tabela 14 apresenta um resumo dos parâmetros e variáveis importantes consideradas na escolha do micro-organismo a ser utilizado posteriormente para a produção de BS neste trabalho.

Tabela 14 - Principais resultados cinéticos da produção de biossurfactante por *Bacillus sp.* Jag 248, ICA 24 e *B. subtilis* ICA 56.

Micro-organismo	S ₀	pH	ΔS (%)	X _{max} (g/L)	P _{max} (mg/L)	Y _{p/x} (g/g)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	P _x (g/L h)	P _p (mg/L h)
Jag 248 ^a	9,23 ± 0,93	6,74 ± 0,10	100 ± 0,0	1,49 ± 0,24	112,31 ± 3,68	0,076	0,161	0,012	0,03	2,34
ICA 24 ^b	9,15 ± 1,46	6,72 ± 0,04	100 ± 0,04	2,91 ± 0,00	198,86 ± 0,00	0,068	0,317	0,022	0,04	2,76
ICA 56 ^b	9,79 ± 2,54	6,84 ± 0,44	100 ± 0,0	1,92 ± 0,86	224,34 ± 1,95	0,117	0,200	0,023	0,03	3,12

Nota: ^a Dados obtidos no ponto de 48 horas; ^b dados obtidos no ponto de 72 horas; S₀: concentração de substrato no início do ensaio; ΔS: conversão do substrato; Y_{p/x}: conversão de célula em produto; Y_{x/s}: conversão de substrato em células; Y_{p/s}: conversão de substrato em produto; P_{max} é a concentração máxima de biossurfactante, X_{max}: concentração máxima de biomassa; P_x: produtividade em biomassa; P_p: produtividade em surfactina. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados representam as médias ± desvios padrão dos dois experimentos independentes.

Diante dos resultados obtidos (Tabela 14) e de acordo com o que a literatura reporta (NIELSEN & LIDÉN, 2002), dentre os micro-organismos testados, optou-se pelo micro-organismo *B. subtilis* ICA 56, por apresentar valores superiores de P_{max} , $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$, P_P , parâmetros estes que descrevem aduadamente o perfil típico dos processos de produção. Altmajer Vaz e colaboradores (2012) obtiveram rendimento da produção de biossurfactante purificado de $Y_{P/X} = 0,20$ g/g. França e colaboradores (2011) ao avaliarem a aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em biorremediação *in situ*, obtiveram valores de $Y_{X/S} = 0,112$, $Y_{P/X} = 0,194$ e $Y_{P/S} = 0,022$ g/g. Os resultados reportados pelos autores assemelham-se aos obtidos no presente estudo.

Em estudos desenvolvidos em paralelo a este com a cepa de *B. subtilis* ICA 56 no Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio), França (2014), ao otimizar a produção de biossurfactante obteve concentração de biossurfactante de 1290 mg/L utilizando glicerol como fonte de carbono, o que torna relevante a escolha por esse micro-organismo.

5.2. Aplicação do micro-organismo ICA 56 em testes de degradação de contaminantes em areia

5.2.1. Inibição do crescimento de *B. subtilis* ICA56 por diferentes contaminantes

Estudou-se a capacidade de crescimento da cepa de *B. subtilis* ICA 56 em ambientes contaminados com diferentes resíduos potenciais ofensores ao meio ambiente, para posteriormente verificar o potencial de degradação/consumo desses contaminantes pelo micro-organismo em estudo. Verificou-se que o micro-organismo é um bom produtor de um potencial biotensoativo, podendo ser capaz de degradar diversos contaminantes. A Figura 7 apresenta fotos das placas com repique microbiano e poços contendo os contaminantes a serem testados no início do ensaio e a Figura 8, após 48 horas de incubação a 30 °C.

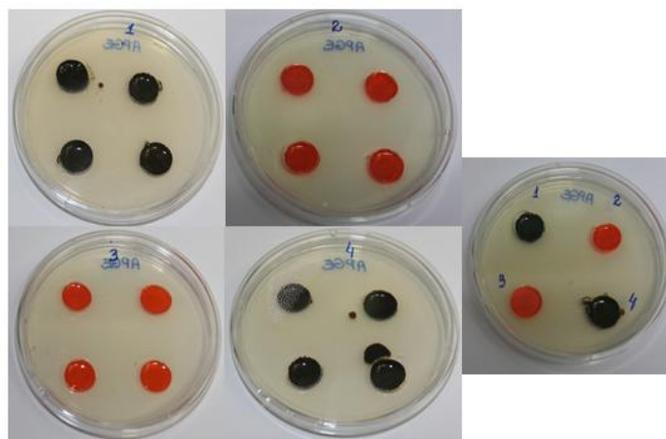


Figura 7 - Placas APGE (ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) inoculadas com *B. subtilis* ICA56 na presença de diferentes contaminantes ambientais no início do teste; (1 – Óleo lubrificante usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha).

A Figura 8 apresenta os resultados qualitativos para inibição de crescimento bacteriano frente aos contaminantes testados após 48 horas de incubação em estufa a 30 °C.

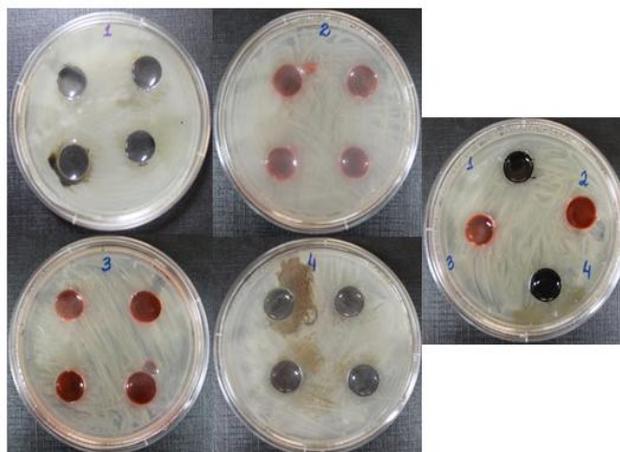


Figura 8 - Placas APGE (ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) inoculadas com *B. subtilis* ICA56 na presença de diferentes contaminantes ambientais após 48 horas de incubação a 30 °C (1 – Óleo lubrificante usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha).

Como pode ser observado na Figura 8, não houve inibição do crescimento bacteriano para nenhum dos óleos avaliados. A avaliação é feita mediante medida da zona ou halo de inibição de crescimento partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismos (BARRY & THORNSBERRY, 1991), porém não houve formação de halo próximo aos poços contendo os contaminantes. Tal resultado aponta para resistência do micro-organismo ICA 56 frente aos contaminantes ambientais testados.

5.2.2. Degradação em placa

Após avaliar a resistência do micro-organismo produtor de biossurfactante ICA56 aos contaminantes testados adsorvidos em areia, resolveu-se verificar seu poder de degradação dos mesmos.

A Figura 9 apresenta a avaliação macroscópica da degradação do petróleo frente a diferentes concentrações, incubado a 30 °C, por 15 dias.

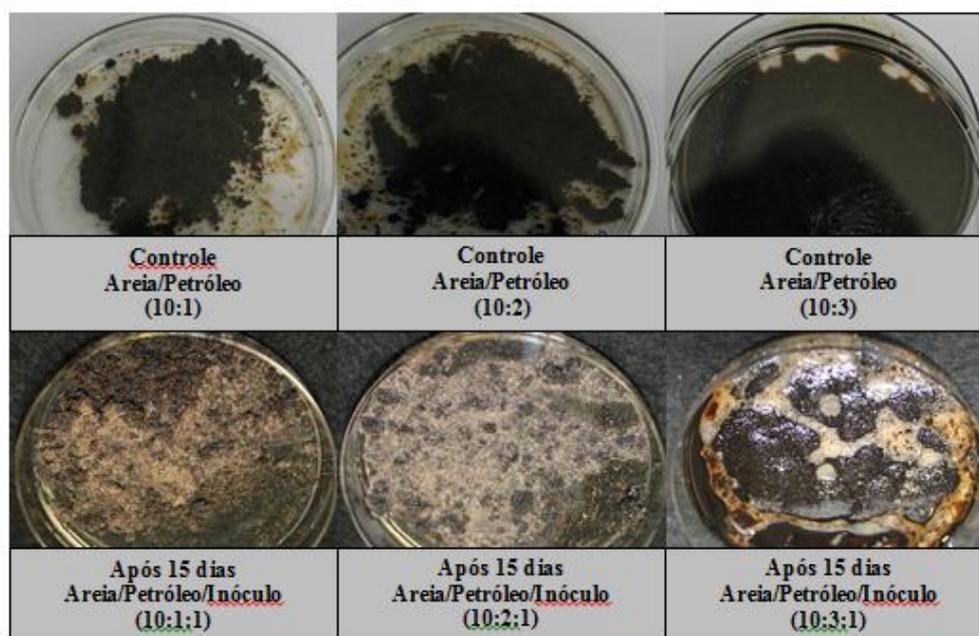


Figura 9 - Degradação em placas de areia contaminada com diferentes concentrações de petróleo por inóculo de *B. subtilis* ICA56.

Observa-se que há degradação com o passar dos dias, mesmo aumentando a concentração de petróleo o inóculo bacteriano continua agindo. Acredita-se a utilização de concentrações mais elevadas de petróleo possibilita um melhor acesso das células ao substrato, facilitando a ação do micro-organismo frente ao petróleo. Bueno e colaboradores (2010), ao realizarem estudo semelhante a este, verificaram através da observação macroscópica que a bactéria *Bacillus pumilus* degradou o petróleo bruto deixando-o mais fluido. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, reportando a possibilidade do emprego da técnica apresentada em limpeza de incrustações nas empresas de petróleo e em derramamento no meio ambiente.

A Figura 10 representa a avaliação macroscópica feita para degradação de óleo lubrificante usado, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80/20) virgem, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80/20) usado.

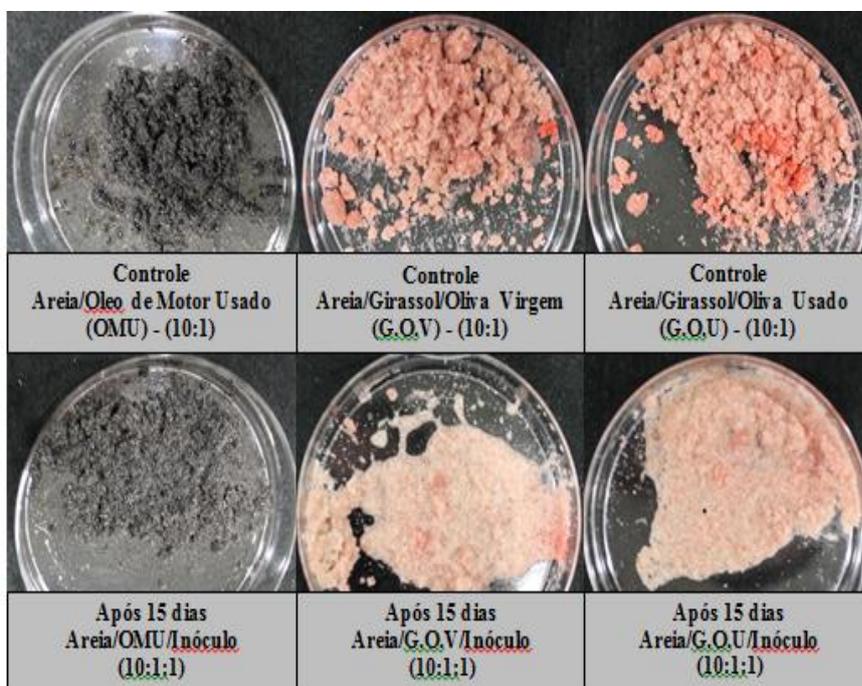


Figura 10 - Degradação em placas de areia contaminada com Óleo lubrificante usado, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80:20) virgem e Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80:20) usado por inóculo de *B. subtilis* ICA56.

Ao se analisar o aspecto das amostras antes e após o tratamento com o inóculo bacteriano de *B. subtilis* ICA56 (Figura 10) acredita-se que houve consumo dos contaminantes pelo micro-organismo. Para Óleo lubrificante usado, percebeu-se pouca diferença de coloração, no entanto após 15 dias, verificou-se que a areia da placa contendo inóculo bacteriano apresentava uma coloração mais clara que a do controle (sem inóculo), indicando ação do micro-organismo no contaminante. O óleo lubrificante usado possui coloração bastante escura e também muitos metais pesados. Silveira e colaboradores (2006) relatam que os óleos lubrificantes usados apresentam elevados níveis de hidrocarbonetos e de metais, sendo os mais representativos ferro, chumbo, zinco, cobre, cromo, níquel e cádmio quando comparados com seus respectivos óleos novos. Quando lançados nas redes de drenagem de águas residuais poluem os meios receptores hídricos e provocam também estragos importantes nas estações de tratamento de águas residuais (BORIN & POPPI, 2004), fazendo-se necessário o tratamento adequado desses resíduos a fim de evitar contaminações ambientais.

Quanto aos testes realizados com as misturas óleo girassol/oliva (80:20) virgem e usado, verificou-se que também ocorreu a degradação do contaminante. Vedaraman e Venkatesh (2011) ao realizarem estudo da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* MTCC 2423 utilizando óleos residuais, observaram que o substrato utilizado mostrou-se como uma potencial fonte de carbono para a obtenção do bioproduto, confirmando que o micro-organismo é capaz de degradar os resíduos analisados.

5.3. Caracterização estrutural do biossurfactante

5.3.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para *Bacillus sp.* LAMI005 e ICA 56

A caracterização dos biossurfactantes excretados por *Bacillus subtilis* LAMI005 (micro-organismo amplamente estudado no Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos - GPBio) e ICA 56 (micro-organismo selecionado para dar continuidade ao presente estudo) foi realizada mediante Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR).

As Figuras 11 e 12 apresentam os resultados obtidos para os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LAMI005 e ICA 56. Os resultados da Figura 11 são apresentados na frequência de 4000 a 400 cm^{-1} e da Figura 12 na frequência de 400 a 4000 cm^{-1} .

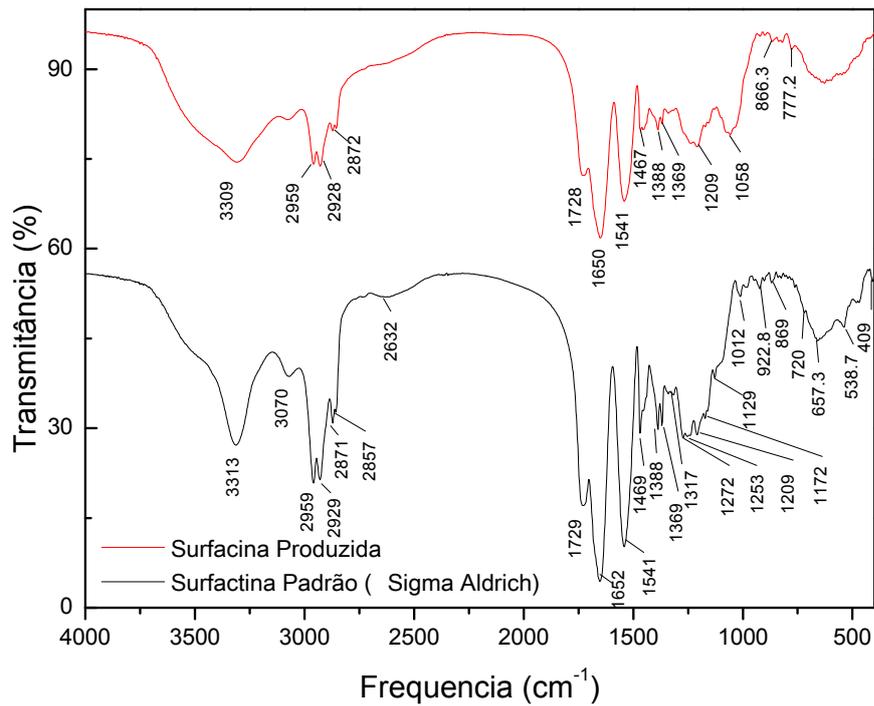


Figura 11 - FTIR - espectrograma vibracional na região do infravermelho para surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina semi purificada excretada por *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivada em suco de caju clarificado (CAJC) + sulfato de amônio (1,0 g.L⁻¹) em \approx 60 g.L⁻¹ de ART, 30 °C e 180 rpm.

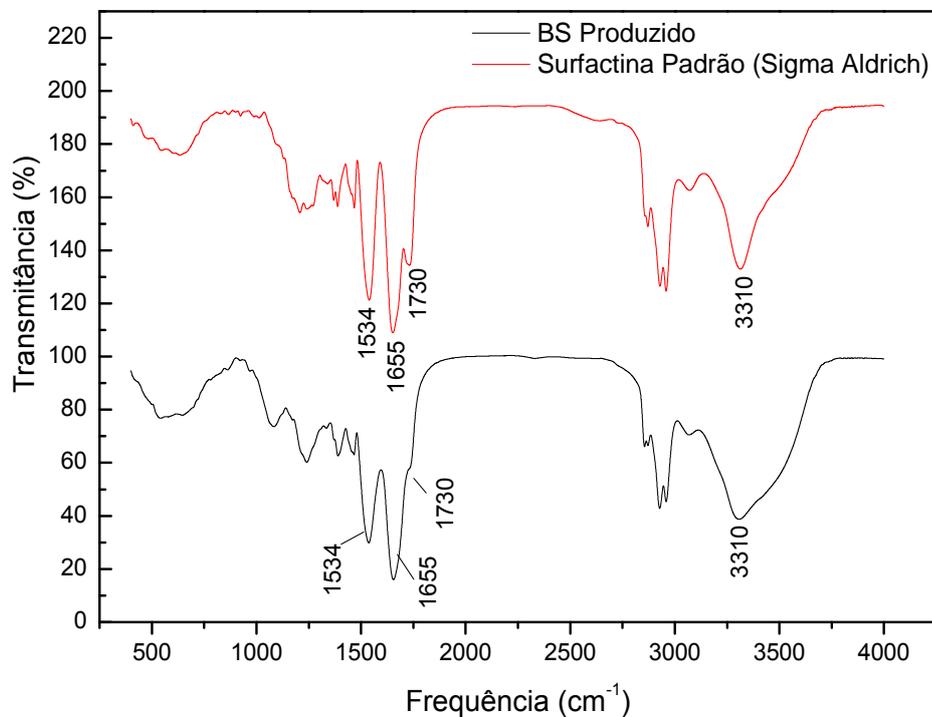


Figura 12 - FTIR - Espectrogramas vibracionais na região do infravermelho para surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina dialisada e liofilizada, excretada por *B. subtilis*. ICA56 cultivada em meio mineral, a 30 °C, 150 rpm, 48 horas.

Analisando-se os espectros vibracionais apresentados nas Figuras 11 e 12 na região do infravermelho (FTIR) de amostras de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LAMI005 e ICA 56, assim como da surfactina padrão (Sigma Aldrich, 95% de pureza) verificou-se nas suas bandas características de peptídeos, indicando as seguintes ligações: 3430: NH, 1655: CO, 1534:CN e canais alifáticos (3000-2800, CH₂ e CH₃), indicando que esse composto é um lipopeptídeo. Também foi observada uma banda correspondente ao grupo carbonil ester (1730:CO). Não foi observada diferença significativa entre os espectros IR da surfactina semipurificada produzida extracelularmente a partir da cultura de *Bacillus subtilis* LAMI005, ICA 56 e surfactina padrão (Sigma Aldrich) no presente estudo. Considerando a similaridade apresentada nos espectrogramas das Figuras 11 e 12, conclui-se que ambos os biossurfactantes obtidos nos processos fermentativos (excretados por *B. subtilis* LAMI005 e ICA 56) correspondem a lipopeptídeos.

5.3.2. Espectrometria de Massa

A Figura 13 (A e B) apresenta os cromatogramas encontrados para a surfactina padrão (Sigma Aldrich) e para a amostra de biossurfactante produzida por ICA56. A surfactina padrão apresenta picos característicos nos tempos de retenção: 0,26; 0,41; 0,97; 1,17; 1,56; 1,65; 2,04 minutos. A amostra de biossurfactante testada apresentou picos semelhantes aos da surfactina padrão (Sigma Aldrich). Sousa e colaboradores (2012) ao realizarem seleção de linhagens produtoras de biossurfactante de *Bacillus* utilizando glicerol como fonte de carbono principal, reportam picos semelhantes aos encontrados no presente estudo. Os autores observaram oito grandes picos nos seguintes tempos de retenção: 9,16; 11,31; 12,51; 15,61; 17,14; 19,28; 21,35 e 24,01 minutos para a surfactina padrão (Sigma Aldrich) em tempos bastante semelhantes para o cromatograma do biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI009. No cromatograma do biotensioativo produzido por *B. subtilis* LAMI005, apenas seis picos em tempos de retenção semelhantes foram observados. Os resultados obtidos por Sousa e colaboradores (2012) indicaram a similaridade na estrutura molecular do biotensioativo produzido. Wei e Chu (2002) em estudos de otimização da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* adicionando Mn²⁺ também observaram apenas seis picos em tempos de retenção semelhantes aos obtidos por Sousa e colaboradores (2012).

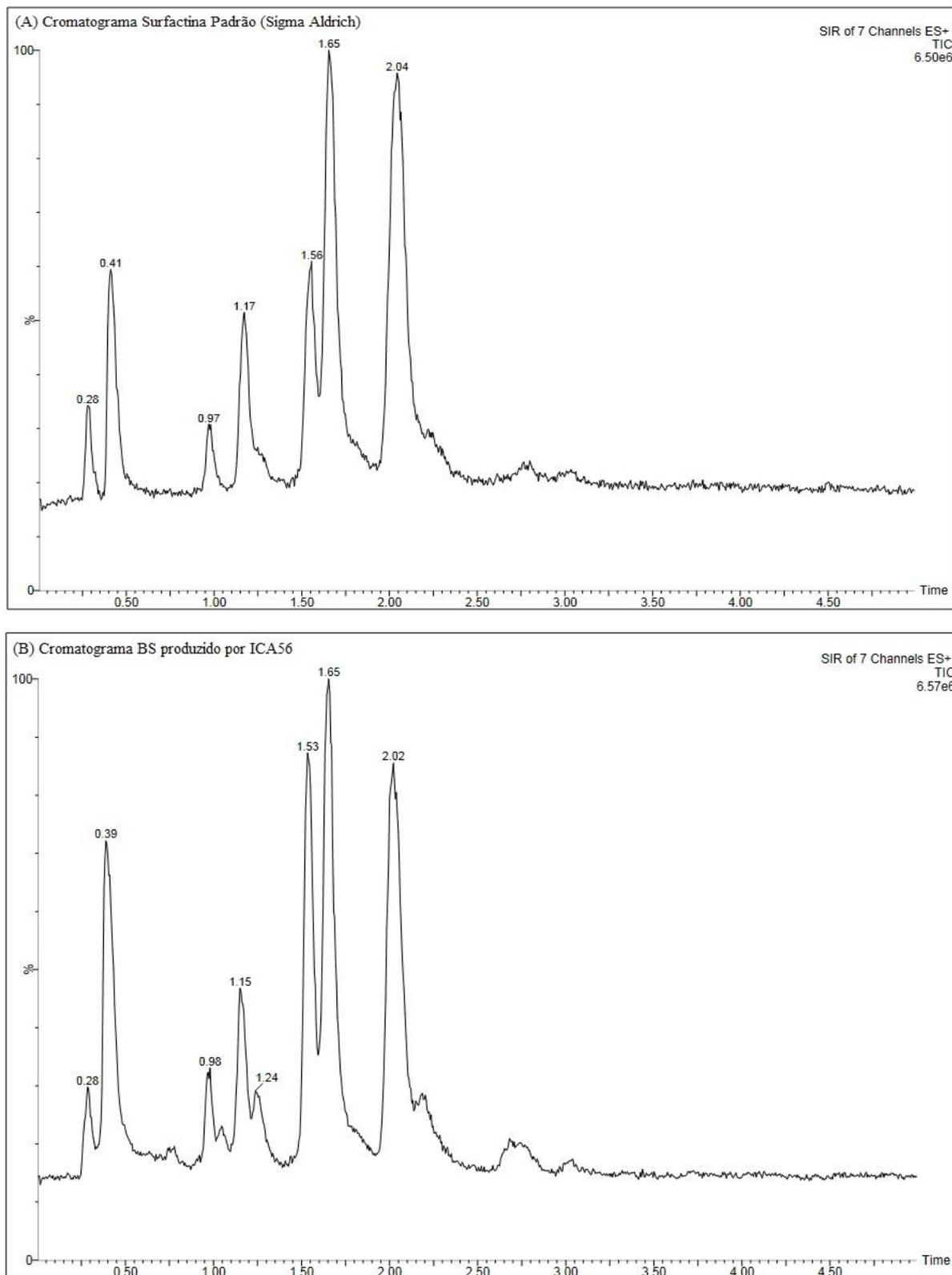


Figura 13 - Cromatogramas em HPLC para (A) Surfactina Padrão (Sigma Aldrich); (B) Biossurfactante bruto liofilizado produzido por *B. subtilis* ICA56.

É importante ressaltar que os tempos de retenção aqui apresentados diferem dos tempos reportados por Sousa e colaboradores (2012), uma vez que os autores analisaram em HPLC enquanto os resultados aqui apresentados foram analisados em UPLC.

A Figura 14 (A e B) apresenta os espectrogramas com as massas moleculares encontrados para a surfactina padrão (Sigma Aldrich) e para a amostra de biossurfactante produzida por ICA56. Verificou-se que os pesos moleculares encontrados na amostra padrão repetem-se na amostra produzida nos mesmos tempos de retenção permitindo classificar o lipopeptídeo da amostra como sendo surfactina. Ocorre aumento da cadeia alifática através do ganho de grupos metilênicos, que corresponde a uma variação de m/z de 14 unidades. O que diferencia o biossurfactante produzido por ICA 56 da amostra de surfactina padrão (Sigma Aldrich) é a proporção entre as isoformas, relacionado à intensidade de cada pico no espectro de massa. Felix (2012) ao caracterizar estruturalmente o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005, relata que o espectro de massa de alta resolução (EMAR), obtido com ionização por eletrospray e no modo negativo, mostrou picos em m/z 1034,6840 e 1020,6700 $[M - H]$, assemelhando-se ao resultado aqui obtido. Felix (2012) reporta ainda que os picos encontrados em suas análises indicam as fórmulas moleculares $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ e $C_{52}H_{91}N_7O_{13}$ para o biossurfactante produzido e para a surfactina padrão (Sigma Aldrich), respectivamente, e que o lipopeptídeo produzido no referido trabalho difere da amostra padrão (Sigma) quanto ao número de grupos metilênicos (-CH₂-) presente na cadeia alifática, apresentando um a mais. Pereira e colaboradores (2013) caracterizaram o biossurfactante por diferentes cepas de *B. subtilis*. Os autores apresentam o espectro MALDI-TOF dos biossurfactantes obtidos a partir de cada isolado (#309, #311 e #573), onde os espectros de massa mostram que há um grupo bem resolvido dos picos em valores m/z entre 1000 e 1060 e que esse grupo pode ser atribuído para as diferentes variantes de surfactina. Os espectros obtidos pelos autores apresentaram picos que podem ser atribuídos às formas protonadas, com aductos de sódio. Cada espectro isolado exhibe três $[M + Na]^+$ picos a $m/z = 1030,6$, $1044,6$ e $1058,7$, correspondentes ao heptapéptido radical (L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu) característica de surfactina, ligado a uma cadeia de ácidos graxos hidroxilados C13, C14 ou C15, respectivamente.

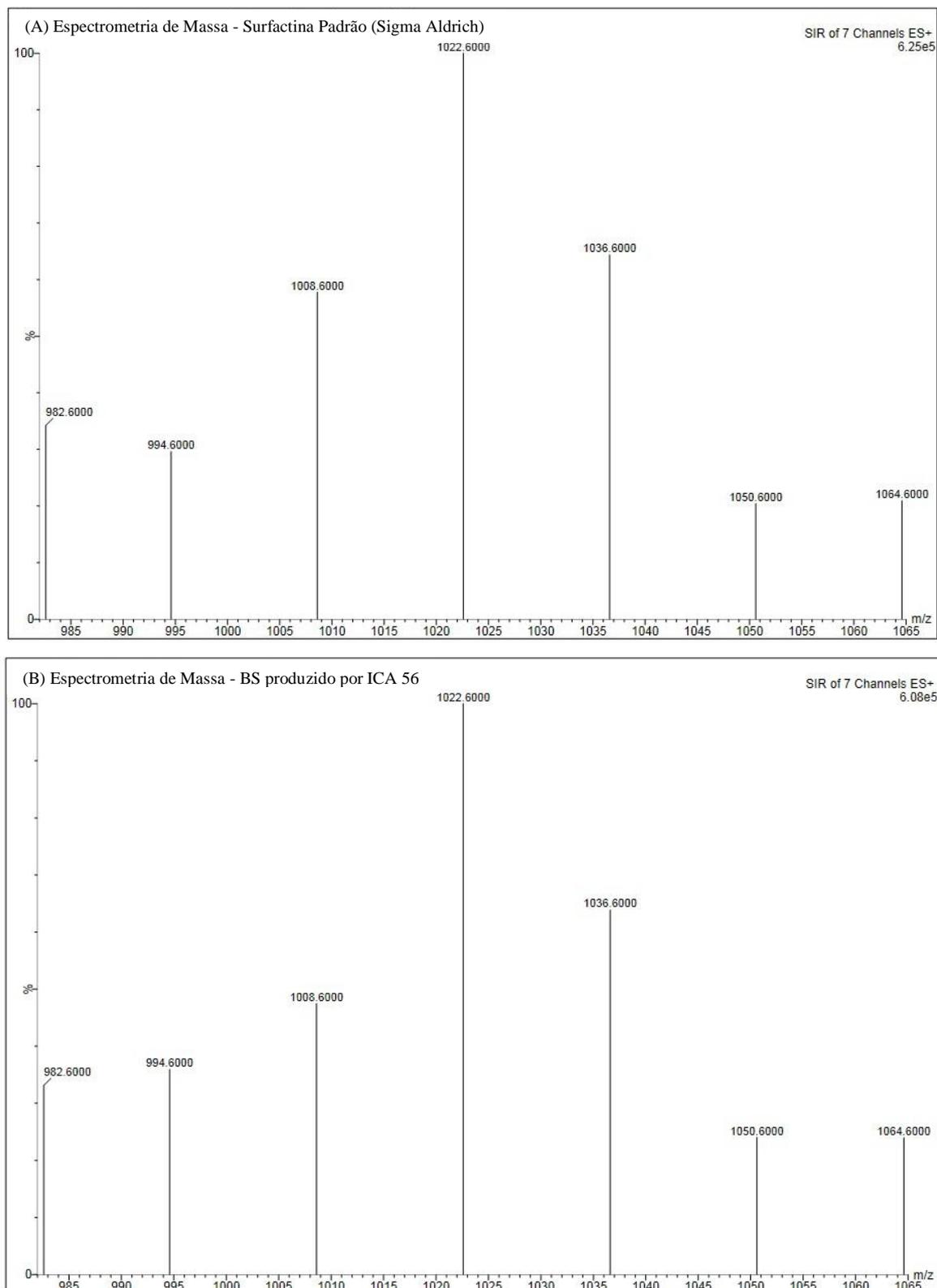


Figura 14 - Espectrogramas de massa para: (A) Surfactina Padrão (Sigma Aldrich); (B) Biossurfactante dialisado e liofilizado produzido por *B. subtilis* ICA56.

5.4. Caracterização físico-química do biossurfactante produzido por ICA 56

5.4.1. Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

Conforme mostrado na Figura 4 (D), acompanhou-se a variação da tensão superficial do meio de cultivo livre de células em função do tempo de fermentação. Os valores da TS das amostras tomadas do meio de cultivo livre de células no início da fermentação (0 h) e no tempo de 48 horas de fermentação são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Tensão superficial (TS) do meio de cultivo livre de células no início das fermentações realizadas para produção de biossurfactantes pelo micro-organismo *B. subtilis* ICA56 e após 48 horas de ensaio.

Tempo (h)	TS (mN/m)	SD
0	65,75	0,70
48*	26,44	0,10

Nota: * resultado da menor tensão obtida nos cultivos realizados no tempo de 48 horas.

A redução de tensão superficial é um importante parâmetro a ser acompanhado durante ensaios fermentativos que visam produzir biossurfactantes, visto que é um dos fatores mais indicativos de sua produção. Observa-se na Tabela 5.6 uma redução de 60% da tensão superficial do meio fermentado livre de células em relação ao meio de cultivo no tempo zero. Esta relevante redução na tensão superficial coloca em evidência a produção de agentes de superfície durante a fermentação. Decesaro e colaboradores (2013), ao estudarem a produção de biossurfactantes por uma linhagem de *Bacillus* isolada de solo contaminado com óleo diesel, obtiveram um valor de tensão superficial do meio de cultivo livre de células de 35,67 mN/m. Os autores deste trabalho constataram redução da tensão superficial na ordem de 33%.

Na Tabela 16 apresentam-se os resultados de CMC e de tensão superficial obtidos a 25, 45 e 65 °C do biossurfactante bruto (BS que apenas passou pelo tratamento de precipitação ácida e posteriormente liofilizado). Os testes foram conduzidos em triplicata. Observa-se que os valores de CMC variam entre 0,02 g/L (25 °C) e 0,03 g/L (65 °C), indicando um leve aumento com a temperatura. A CMC do biossurfactante bruto sofre influência significativa da temperatura (verificado mediante análise estatística - ANOVA). Há uma diminuição do valor da TS com a temperatura (de 33,56 mN/m para 31,95 mN/m). De

acordo com Brady e Humiston (1981), este decréscimo da tensão superficial é devido ao aumento da energia cinética das moléculas e a redução das forças interativas intermoleculares.

Tabela 16 - Valores de CMC e Tensão Superficial (TS) obtidos para o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56. Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

T (°C)	CMC (g/L)	TS (mN/m)
25	0,0173 ^a ± 0,002	33,56 ^a ± 0,38
45	0,0231 ^b ± 0,001	33,05 ^b ± 0,81
65	0,0310 ^c ± 0,008	31,95 ^c ± 0,31

Os resultados de CMC obtidos neste trabalho estão de acordo com os trabalhos publicados na literatura, com variação dos valores de tensão superficial na avaliação da CMC de biossurfactantes obtidos a partir de *Bacillus sp.* entre 11 e 40 mN/m (BARROS *et al.*, 2007, ZEIRAK & NITSCHKE, 2010; ALTMAJER VAZ *et al.*, 2012). Sousa e colaboradores (2012) reletaram CMC da surfactina padrão (Sigma Aldrich - pureza $\geq 98\%$) de 7 - 20 $\mu\text{mol/L}$ e para o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI009 e *B. subtilis* LAMI005 de 32,4 mg.L^{-1} e 28,0 mg.L^{-1} , respectivamente, a temperatura ambiente, em torno de 25 °C. Barros e colaboradores (2007) ao estudarem a surfactina e suas propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos, relatam CMC de 19,0 mg.L^{-1} . Altmajer Vaz e colaboradores (2012) obtiveram valores de CMC de 40 mg/L a 20 °C ao estudarem o desempenho de um biotensioativo produzido por uma linhagem de *Bacillus subtilis* isolada a partir de amostras de óleo bruto, em comparação com surfactantes químicos comerciais, avaliados à temperatura ambiente. Liu e colaboradores (2013) em estudo com cepas produtoras de biossurfactante isoladas de campo petrolífero de águas residuais obtiveram valores de concentração micelar crítica (CMC) de 21,8 mg/L . As diferenças nos valores de CMC relatadas pelos diferentes autores podem ser atribuídas aos diferentes graus de purzas do biossurfactantes estudados, já que a presença de sais e/ou produtos do metabolismo celular afeta a determinação da CMC (SAMSON *et al.*, 1990), portanto vale ainda ressaltar que o lipopeptídeo utilizado no presente trabalho não é puro e, ainda assim, os resultados de CMC são satisfatórios. De acordo Rosen (1989) e Lima (2007), existem duas classes de materiais que afetam as concentrações micelares críticas, sendo a classe 1, por incorporação na micela e a classe 2 pela modificação da interações solvente-micela ou solvente-surfactante.

Considerando que a CMC encontrada a 25 °C foi de $17,30 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, cabe destacar que, embora os valores de CMC dos lipopeptídeos estejam de acordo com os estudos relatados na literatura, são considerados baixos quando comparados aos surfactantes sintéticos

Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil)

aniônicos (ALTMAYER VAZ *et al.*, 2012). Por exemplo, ao comparar os valores de CMC do biossurfactante produzido com um surfactante aniônico comumente utilizado na indústria, o dodecil sulfato de sódio (SDS) que apresenta uma CMC de 2333 mg.L^{-1} (TAVARES, 1997), percebe-se a importância do investimento em estudos na produção dos biossurfactantes. O surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS) apresenta uma CMC cerca de 135 vezes mais que a do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56.

5.4.2. Ângulo de Contato (AC) e Tensão Interfacial (TI)

Realizou-se avaliação do ângulo de contato e tensão interfacial a partir de soluções do biotensoativo.

A Tabela 17 apresenta os resultados das medidas de ângulo de contato para três concentrações (10, 20 e 60 mg/L) do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56. Mediante Análise de Variância (ANOVA) verifica-se que os valores de AC obtidos com a concentração de 10 mg/L de biossurfactante são equivalentes ao da água ultra-pura (MilliQ), posto que não se detectam diferenças significativas. Já para os valores de ângulo de contato obtidos com concentrações de 10 e 20mg/L de biotensoativo, obtém-se diferenças significativas no AC em função da concentração ensaiada. Finalmente, não existem diferenças significativas entre os resultados de ângulo de contato obtidos com soluções de biossurfactante de 20 e 60 mg/L.

Tabela 17 - Resultados obtidos para ângulo de contato realizado a 25 °C usando diferentes concentrações de biossurfactante bruto produzido por *B. subtilis* ICA56.

C (mg/L)	AC (°)
0	103,91 ± 1,54
10	104,37 ± 4,31
20	89,20 ± 5,52
60	92,07 ± 1,55

Os dados mostram uma pequena diminuição nos valores de ângulo de contato com o aumento da concentração do biossurfactante. A 25 °C, os valores de AC obtidos com a concentração de 10 mg/L de biossurfactante são praticamente equivalentes ao da água ultra

pura (MilliQ), no entanto essa concentração corresponde a metade da CMC do biossurfactante a 25 °C.

A medida do ângulo de contato de uma gota sobre uma superfície é indicativo da capacidade de molhamento de uma superfície por dita solução. Quanto menor que 90°, pode-se considerar que a superfície é hidrofílica, porém se os ângulos forem maiores que 90°, caracterizam-se superfícies hidrofóbicas (MOITA NETO, 2006; YUAN & LEE, 2013). No caso da água, se a superfície de deposição for hidrófoba (com ceras), o contato será menor, a gota será esférica e o ângulo de contato será maior. Entretanto, se a superfície for mais hidrófila, a gota se espalhará, podendo até formar um filme uniforme (IOST & RAETANO, 2010). Estudos de molhabilidade geralmente envolvem a medição de ângulos de contato, os dados primários, indicam o grau de molhagem, quando um sólido e líquido interagem. Zeirak e Nitschke (2010) estudaram as mudanças na hidrofobicidade em superfícies tratadas com surfactina. Segundo os autores, a surfactina causa alterações no ângulo de contato de 82 ° para cerca de 76 °, indicando que a superfície tornou-se menos hidrófoba quando previamente tratada com soluções de surfactina. Rodrigues e colaboradores (2006) também afirmaram que essas mudanças na hidrofobicidade em superfícies repercutem em uma diminuição substancial da adesão de bactérias, sendo este comportamento especialmente interessante para aplicações em áreas médicas.

Na Figura 15 apresentam-se os resultados de tensão interfacial (IFT) entre as soluções de biossurfactante (0, 1/2 CMC, CMC, 3x CMC) e dodecano a diferentes temperaturas (25, 45 e 65 °C). A Análise de Variância (ANOVA) de duas vias indica que a concentração de biossurfactante afeta de forma significativa a tensão interfacial, sendo esta influência igualmente detectável a concentrações superiores a CMC. Por outro lado, de acordo com ANOVA, a temperatura (intervalo de 25 a 65 °C) não exerce um efeito significativo sobre IFT.

Conforme o esperado, nos ensaios controle realizados com água destilada, obtém-se uma redução clara de IFT com o aumento de temperatura (Figura 15), efeito não observado em presença de biossurfactante. Neste sentido, Rosen (2004) destaca que o aumento de temperatura afeta a adsorção do agente de superfície nas interfaces ar-líquido e líquido-líquido, podendo alterar a capacidade de diminuição da tensão interfacial por parte do tensoativo.

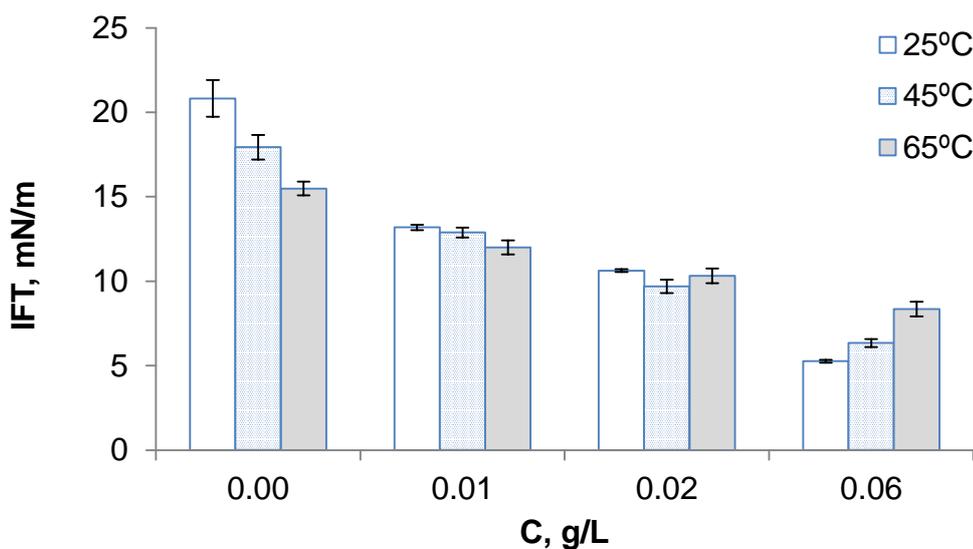


Figura 15 - Valores de tensão interfacial (TI) obtidos a diferentes temperaturas e concentrações de biosurfactante bruto liofilizado produzido por *B. subtilis* ICA 56.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram relatados por outros pesquisadores. Deleu e colaboradores. (1999) obtiveram valores de tensão interfacial para soluções de 100 mg/L de surfactina frente a dodecano de 5 mN/m. Do mesmo modo, Pereira e colaboradores (2013) em estudos sobre produção de biosurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis* obtiveram resultados de tensão interfacial em torno de 5,0 mN/m ao utilizarem concentração de 1,0 g/L da solução de biosurfactante, enquanto para concentrações em torno de 20 mg/L, os resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo. Al-Bahry e colaboradores. (2013) realizaram medidas de IFT de soluções de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* a diferentes temperaturas (40 a 100°C), obtendo o mesmo comportamento observado neste trabalho.

5.5. Estabilidade do biosurfactante produzido por ICA 56

5.5.1. Índice de Emulsificação (IE₂₄) e estabilidade de emulsões

Realizou-se o teste de índice de emulsificação a 25°C acompanhando a estabilidade das emulsões formadas com dodecano durante 14 dias. A Tabela 18 apresenta os

dados de índice emulsão obtidos após 24 e horas de ensaio e no final da observação, após 336 horas de experimento (IE₂₄).

Tabela 18 - Índice de Emulsão % (IE₂₄) obtidos após 24 h e 336 h de observação a partir de soluções de biossurfactante bruto produzido por *B. subtilis* ICA56.

Concentração de biossurfactante (g/L)	IE ₂₄ (%) 24 h Média +/- SD	IE ₂₄ (%) 336 h Média +/- SD
0,1	10,00 ± 2,02	08,57 ± 0,00
0,5	48,57 ± 0,00	34,28 ± 0,00
1,0	62,86 ± 0,00	54,28 ± 4,00

Para concentrações de biossurfactante de 0,5 e 1,0 g/L, obteve-se uma redução no índice de emulsão (IE₂₄) de 29,42% e 13,65%, respectivamente. A maior desestabilização é observada na concentração de 0,1 g/L. Sendo assim, e conforme o esperado, o aumento da concentração de biossurfactante exerceu um efeito positivo (e significativo) sobre o índice de emulsão. Resultado semelhante foi observado por Barros e colaboradores (2008) em estudo de estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LB5a e em diferentes óleos vegetais, onde os autores relataram que cinco emulsões apresentaram uma redução percentual do IE maior que 10% (milho:26,0%; oliva:15,8%; babaçu:17,3%; algodão:17,6% e gergelim:62,9%) no período analisado entre 24 e 96 horas.

Estudos de emulsificação com concentrações similares as utilizadas neste trabalho foram também realizados por outros pesquisadores. Por exemplo, Deleu e colaboradores (2009) avaliaram a cinética de desestabilização de emulsões formadas por hexadecano e soluções de lipopeptídeos com concentrações de 5 a 10 vezes a CMC. Altmajer Vaz e colaboradores (2012) determinaram os valores de índice de emulsificação usando concentrações de lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* de 0,1, 0,5 e 1,0 g/L (todas as concentrações avaliadas são superiores a CMC do biossurfactante, 0,04 g/L). Verifica-se que em todos os estudos realizados não se obtém uma relação simples entre as propriedades interfaciais e o poder emulsionante dos biotensoativos (PIOTROWSKI *et al.*, 2012; WILDE, 2000). Obviamente, os baixos valores de tensão interfacial obtidos na CMC do tensoativo facilita a formação de emulsões, uma vez que diminui a quantidade de energia requerida para aumentar a área interfacial, ainda que esta condição pode não ser suficiente para produzir emulsões estáveis.

A estabilidade das emulsões preparadas pode ser avaliada mediante monitoramento do índice de emulsão ao longo do tempo. Mediante análise estatística (ANOVA), observa-se que não existem diferenças significativas entre os valores de IE obtidos nas primeiras 24 horas de experimento. Entretanto, a partir de 24 horas, detecta-se uma significativa desestabilização das emulsões preparadas. Este efeito é mais perceptível a medida que se diminui a concentração de biossurfactante. A Figura 16 apresenta os resultados completos dos ensaios de estabilidade da emulsão ao longo de 14 dias de experimentação.

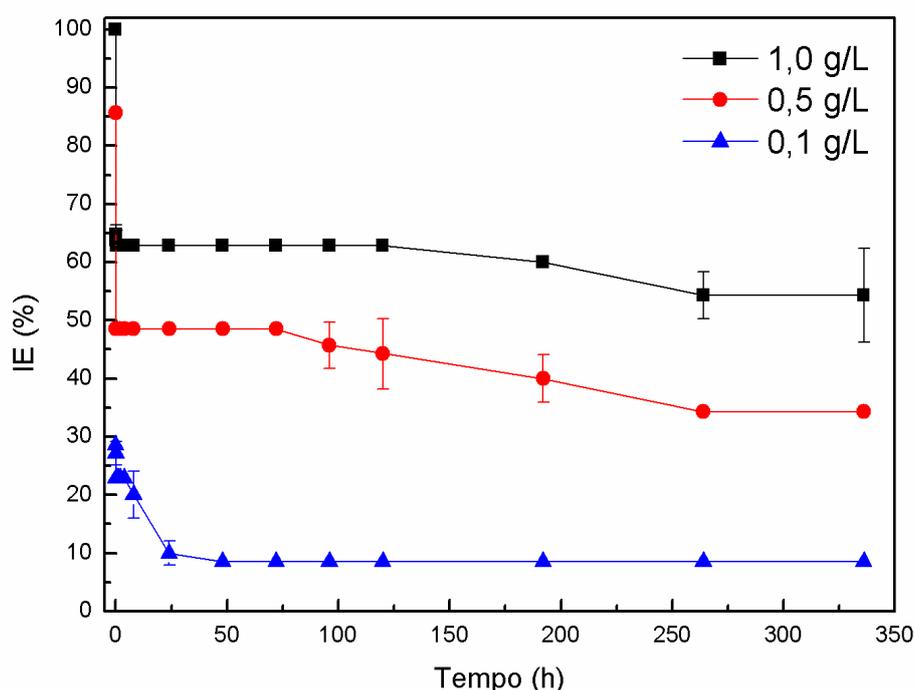


Figura 16 - Resultados obtidos para índice de emulsificação (IE%) de amostras preparadas em vortex mantidas a 25 °C por 14 dias utilizando diferentes concentrações do biossurfactante bruto liofilizado produzido por *B. subtilis* ICA 56.

A Figura 16 evidencia a relação existente entre concentração de biotensioativo e desestabilização das emulsões. Para a concentração de 0,1 g/L de biossurfactante se observa uma rápida desestabilização logo nas primeiras horas de ensaio. Segundo Faria (2010), altos valores de atividade emulsificante sugerem aplicações na indústria petrolífera para limpeza de borras oleosas em tanques de armazenamento de óleo cru, na mobilização de óleos em dutos e na recuperação melhorada do petróleo.

Altmajer Vaz e colaboradores (2012) observaram comportamento semelhante ao avaliarem o desempenho da produção de biossurfactantes por linhagem de *Bacillus subtilis* isoladas de óleo cru comparado com surfactantes químicos comerciais. Nas maiores concentrações de biossurfactante avaliadas (1,0 e 0,5 g/L), a estabilidade praticamente se

manteve 40 e 60% ao longo das 336 horas de observação, enquanto para 0,1 g/L a desestabilização das emulsões ocorreu nas primeiras horas de ensaio.

5.5.2. Estabilidade do biossurfactante produzido frente à temperatura, pH e força iônica

Estudou-se a estabilidade do biossurfactante produzido por ICA56 frente a variações de temperatura, pH e concentração de NaCl. A Figura 17 apresenta os resultados de estabilidade do biossurfactante a pH 7,0 frente as diferentes temperaturas estudadas (25, 45 e 65 °C).

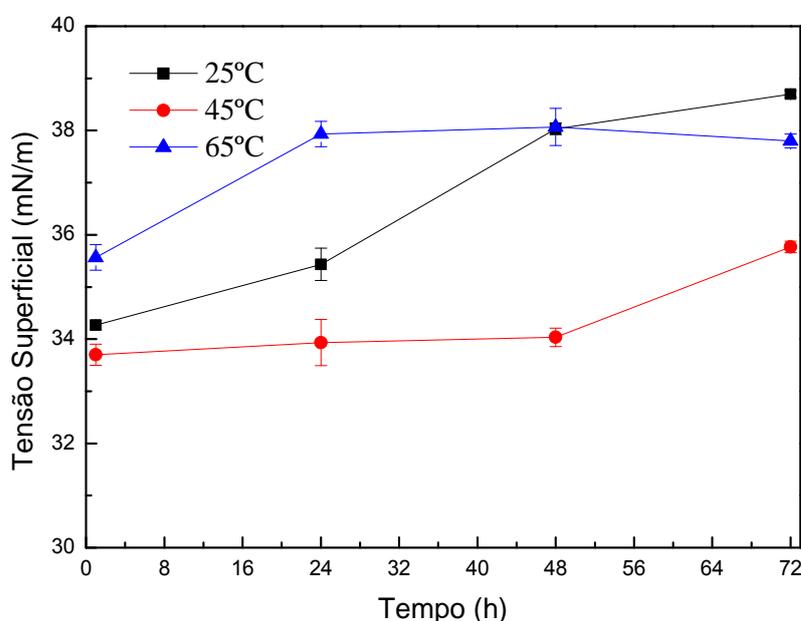


Figura 17 - Estabilidade do biossurfactante produzido por *B.subtilis* ICA56 a diferentes temperaturas e intervalos de tempo (25, 45, 65 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72h).

Analisando-se os resultados obtidos (Figura 17) observa-se que no intervalo 25 - 65 °C, os valores de tensão superficial variam entre 34 e 38 mN/m. Na temperatura de 25 °C, existe um aumento gradativo da tensão superficial ao longo do tempo, indicando que o BS apresenta perda da sua estabilidade na condição estudada. Esse comportamento do aumento da tensão superficial é mais evidente entre 1,0 h e 48 horas, apresentando-se estável entre 48 e 72 horas.

Após 24 horas, observa-se uma maior variação da tensão superficial no ensaio a 65 °C, que logo tende a manter-se constante. Obteve-se uma maior estabilidade do

biotensoativo na temperatura de 45 °C, sendo que a tensão superficial se manteve em torno de 33,5 mN/m até 48 horas, apresentando um pequeno aumento em 72 horas de ensaio para aproximadamente 35,0 mN/m. Cabe destacar que as soluções de biossurfactante apresentaram baixos valores de tensão superficial após uma hora de submissão às temperaturas estudadas, com valores entre $33,70 \pm 0,20$ mN/m e $35,57 \pm 0,24$ mN/m, apresentando-se estável nessa condição. Altmajer Vaz e colaboradores (2012) obtiveram comportamento semelhante em testes realizados nas temperaturas de 20, 37, 46 e 121 °C com o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* EG1 e diferentes tensoativos comerciais, com valores de tensão superficial em torno de 30mN/m. Barros e colaboradores (2008), ao avaliarem soluções de biossurfactante a 100 °C numa faixa de 0 a 140 minutos, também observaram estabilidade do biotensoativo produzido por *Bacillus subtilis* LB5a, com valores de tensão superficial estáveis, entre 29,0 e 30,5 mN/m.

Em relação a estudos de temperatura, realizou-se ainda, um teste a 120 °C por 60 minutos. A tensão obtida da solução de biossurfactante bruto medida a 25 °C foi de $33,70 \pm 0,07$ mN/m e após submetido a 120 °C, por 60 minutos foi $32,93 \pm 0,31$ mN/m (medida a 25 °C). Houve uma pequena redução da tensão superficial quando a solução do biossurfactante foi submetida à temperatura de 121 °C, apresentando diferença significativa segundo análise estatística - ANOVA. Felix (2012) observou fato semelhante, com diminuição da tensão superficial de 32,1 para 30,9 mN/m após submeter a solução de biossurfactante a 121 °C. Os resultados mostraram que o biossurfactante produzido por ICA56 é resistente a altas temperaturas por períodos prolongados, conforme relatado na literatura, pois manteve baixos valores de tensão superficial mesmo após exposição durante uma hora a 120 °C.

A literatura relata que biossurfactantes que apresentam elevada estabilidade frente à temperatura e pH podem ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas (BANAT, 1993; DAS & MUKHERJEE, 2005). Horowitz e colaboradores (1990) ao estudarem o lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2 verificaram que o mesmo é estável a temperaturas em torno de 75 °C por 140 horas e pH entre 5,0 e 12,0. Resultados semelhantes foram obtidos para o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56.

Após realizarem-se os ensaios com variação de temperatura, optou-se por avaliar o efeito do pH e da concentração de sal a 45 °C, temperatura onde foi observada uma melhor estabilidade do biossurfactante. O efeito do pH sob a estabilidade do biossurfactante pode ser visualizado na Figura 18. Tomando-se como referência os resultados a pH 7,0, observa-se que após 1,0 hora de exposição do tensoativo às condições avaliadas (45 °C variando o pH), existe

um aumento da TS para pH superior a 10,0 e inferior a 5,0. Este comportamento está de acordo com o publicado por outros investigadores (ALTMAYER VAZ *et al.*, 2012), e constatando-se que causa da dita variação é a insolubilização do biossurfactante (lipopeptídeo) em valores extremos de pH.

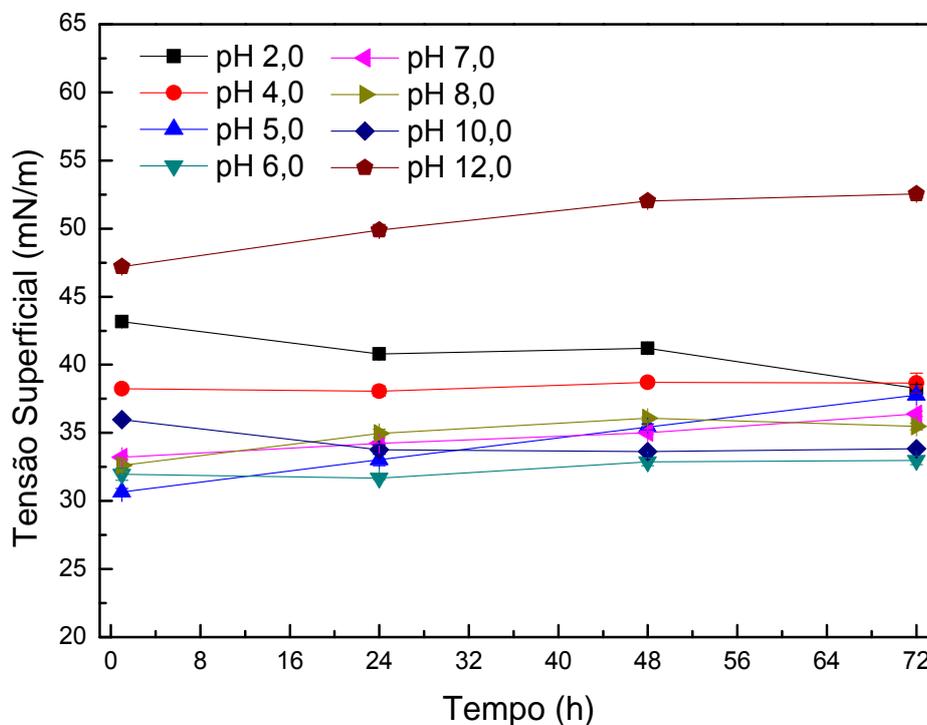


Figura 18 - Estabilidade do biossurfactante frente a variação de pH (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0) a temperatura de 45 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72 horas.

Para melhor visualização da avaliação da estabilidade frente a variações de pH, apresenta-se a Tabela 19 com as médias das medidas de tensão superficial e desvio padrão ao longo do experimento.

Tabela 19 - Resultados da avaliação de estabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 frente a variação de pH (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0) e temperatura de 45 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72 horas.

T (h)	pH 2,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 10,0	pH 12,0
01	43,17 ± 0,18	38,23 ± 0,11	30,67 ± 0,24	31,97 ± 0,44	33,20 ± 0,13	32,60 ± 0,47	35,97 ± 0,16	47,20 ± 0,27
24	40,80 ± 0,20	38,07 ± 0,38	33,03 ± 0,44	31,67 ± 0,09	34,23 ± 0,04	34,97 ± 0,31	33,77 ± 0,36	49,90 ± 0,40
48	41,20 ± 0,27	38,70 ± 0,20	35,43 ± 0,22	32,87 ± 0,29	35,00 ± 0,13	36,07 ± 0,11	33,63 ± 0,18	52,03 ± 0,11
72	38,27 ± 0,29	38,67 ± 0,71	37,77 ± 0,22	32,97 ± 0,31	36,40 ± 0,20	35,47 ± 0,24	33,83 ± 0,09	52,53 ± 0,24

Percebeu-se pouca variação da tensão superficial ao longo das 72 horas de experimentação para os ensaios realizados em pH de 6,0 a 10,0, uma vez que a tensão superficial apresentou valor máximo de $36,40 \pm 0,20$ mN/m após 72 h, pH 7,0.

Como a surfactina precipita em meio ácido, conseqüentemente haverá aumento da tensão superficial em pH de valores iguais a 2,0 e 4,0 (BARROS *et al.*, 2008), o que justifica os resultados observados no presente estudo.

A Figura 19 apresenta os resultados dos ensaios de estabilidade do biotensoativo realizados a 45 °C com diferentes concentrações de NaCl. Como pode ser verificado, nas primeiras 24 horas de experimento, os valores de tensão superficial praticamente permanecem constantes para concentrações de sal de 10 a 30 g/L, enquanto para os ensaios com 40 e 50 g/L de NaCl, existe um aumento abrupto na tensão superficial nas primeiras 24 horas. Somente os experimentos realizados com uma concentração de NaCl de 10 g/L apresentaram valores de tensão superficial estáveis ao longo do tempo (72 h). Para todas as demais concentrações, este comportamento variou, aproximando-se aos 38 mN/m em 72 horas de teste. No entanto, observa-se que as soluções de biotensoativo submetidas por 1,0 hora às referidas condições estudadas (45 °C com concentrações de NaCl entre 10 e 50 g/L), apresentaram valores de tensão superficial entre 29,0 mN/m e 35 mN/m, resultados considerados satisfatórios. Portanto, as primeiras horas de avaliação frente a força iônica mostraram que o biossurfactante apresenta estabilidade.

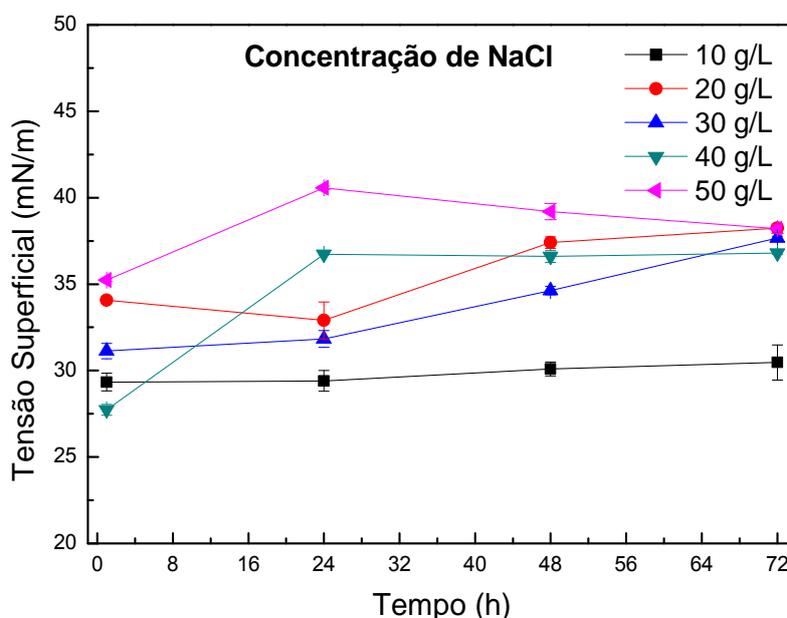


Figura 19 - Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes concentrações de sal e temperatura de 45 °C em intervalos de 1h, 24h, 48h e 72 horas (10, 20, 30, 40 e 50 g/L de NaCl).

Sais iônicos formam interações íon-dipolo com a água. Uma vez que essas interações são mais fortes que as interações entre sal e a fase gasosa, as moléculas desse soluto evitam a interface, causando um aumento da tensão superficial (SHAW, 1970). Segundo Bognolo (1999) os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl, possibilitando a utilização deste em biorremediações de ambientes marinhos (KHOPADE *et al.*, 2011), enquanto concentrações salina de 2 a 3% são suficientes para inativar surfactantes convencionais.

5.6. Aplicação do biossurfactante produzido por ICA 56 para remoção de óleo lubrificante adsorvido em areia

Ensaio de remediação foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação do biossurfactante produzido por ICA56 para este fim, já que devido as excelentes propriedades superficiais e ecológicas, os biossurfactantes podem desempenhar um papel fundamental na resolução de problemas ambientais. Na Tabela 20 se indicam os valores de eficiência de remoção do contaminante (ER,%) obtidos nos diferentes ensaios de remediação realizados.

Os dados experimentais de eficiência de remoção do contaminante apresentados na Tabela 20 foram utilizados para o ajuste de um modelo matemático linear, representado na Tabela 21 que incorpora os efeitos individuais dos fatores, assim como o termo de interação entre os mesmos (conforme indicado na seção 4.12.5, Materiais e Métodos). A validade do modelo e a significância dos diferentes parâmetros foram verificados.

Tabela 20 - Eficiência de remoção (ER%) do contaminante (óleo lubrificante) em ensaios de remediação de solo utilizando o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56.

Concentração de BS (C, mg/L)	Temperatura (T, °C)	Eficiência de remoção (ER, %)
0	25	63.6
10	25	60.1
20	25	70.7
60	25	74.5
0	45	63.6
10	45	76.5
20	45	78.6
60	45	84.0
0	65	75.4
10	65	80.3
20	65	82.4
60	65	85.0
0	25	58.5
0	25	57.6
0	25	58.0

A Tabela 21 apresenta os coeficientes do modelo matemático proposto para a remoção de sujidade nos testes realizados com o biotensioativo produzido por *B. subtilis* ICA56. Os valores dos coeficientes de determinação R^2 e a relação R^2/Q^2 indicam a qualidade do ajuste do modelo. A Análise da Variância, assim como o teste de *lack-of-fit*, indica que o modelo escolhido ajusta satisfatoriamente os resultados experimentais e, portanto, pode ser utilizado para estimar os valores de eficiência de remoção dentro da região experimental investigada.

Tabela 21 - Valores dos coeficientes do modelo para o planejamento experimental. O desvio padrão de cada coeficiente, o valor de p correspondente e o seu intervalo de confiança de 95% também são incluídos.

Coeficientes do modelo	Parâmetros estimados	Desvio Padrão	Valor de p	Intervalo de confiança
$R^2 = 0.884$; $Q^2 = 0.659$				
Constante	75,78	1,15174	1,24E-15	2,53493
C (Concentração do biossurfactante g/L)	6,80294	1,39236	0,00048232	3,06453
T (Temperatura, °C)	6,98247	1,3935	0,00039577	3,06704
C*T	-2,04477	1,65222	0,241635	3,63646

Tal e como é possível verificar, o termo de interação entre a temperatura e as concentrações de biossurfactante ($C \cdot T$) não exerce um efeito significativo na remoção do contaminante. Assim, excluindo-se este parâmetro não significativo (p-valor superior a 0,05), e voltando a ajustar o modelo aos dados experimentais, chega-se a versão simplificada do mesmo indicado na Eq. 5.1. A Figura 20 mostra o gráfico de contorno gerado pela Equação 5.1.

$$Er (\%) = 51,01 + 235,7 \cdot C + 0,39 \cdot T \quad (R^2 = 0,868, Q^2 = 0,801) \quad \text{Equação 5.1}$$

Sendo C a concentração de biossurfactante (g/L), T a temperatura (°C) e Er, a eficiência de remoção do contaminante.

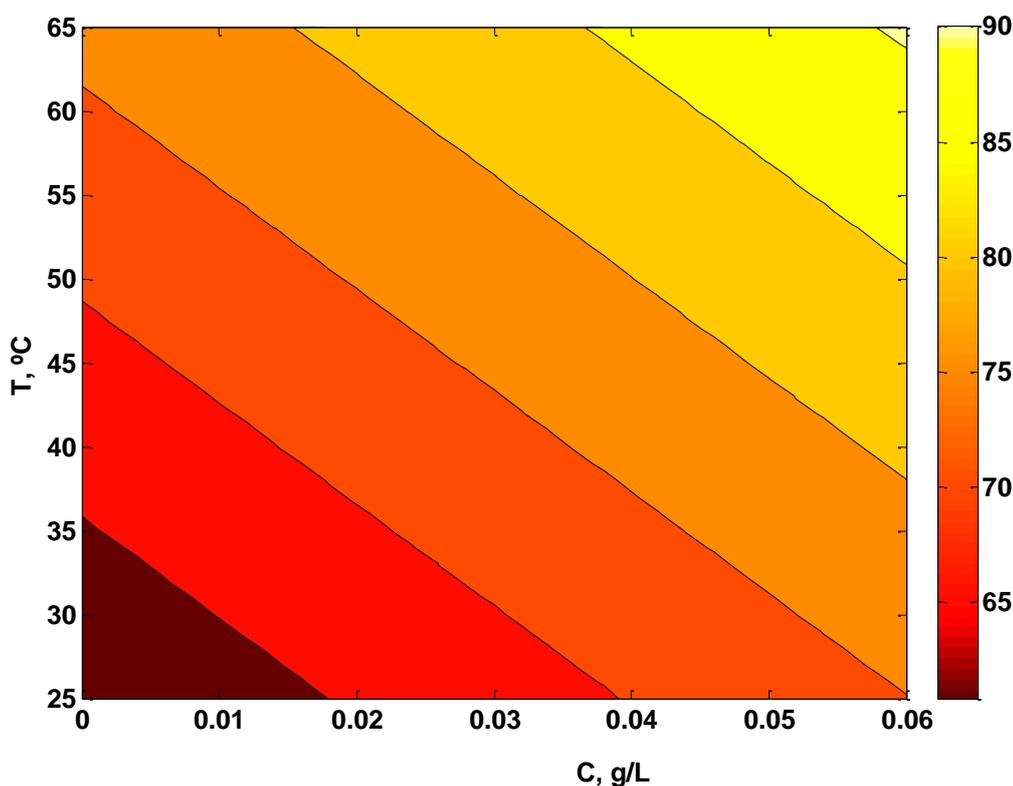


Figura 20 - Gráfico de contorno que relaciona eficiência de remoção com os fatores estudados: temperatura e concentração de biossurfactante.

Os resultados experimentais evidenciam que tanto a temperatura como a concentração de biossurfactante afetam de forma positiva (e significativa) a remoção do óleo lubrificante aderido a areia. Como pode ser visto na Figura 20, a máxima eficiência de remoção do contaminante (ao redor de 90%) é obtida nos extremos superiores de temperatura

e concentração de biossurfactante (65°C e 60 mg/L). O efeito favorável de ambos fatores sobre o processo de descontaminação da areia pode ser explicado pela esperada redução da viscosidade do contaminante com a temperatura e a modificação das propriedades interfaciais do biossurfactante (Figura 15).

Adicionalmente, os valores de eficiência de remoção obtidos nos ensaios controle realizados com água destilada variaram de 60% (25°C) a 75% (65°C), indicando a importância dos efeitos hidrodinâmicos de arraste do contaminante pela passagem do fluido. Resultados semelhantes foram também relatados por Moya-Ramírez e colaboradores (2014).

Analisando-se os resultados experimentais obtidos verificou-se que dados semelhantes de eficiência de remoção do contaminante podem ser alcançados duas condições experimentais diferentes: (a) a 65°C, usando água destilada, e (b) a 25°C, mediante o uso de uma solução de biossurfactante com concentração de 60 mg/L. Dita constatação evidencia que o uso de biossurfactante repercute em uma economia quanto ao consumo energético do processo.

É fato conhecido que dois mecanismos diferentes podem ser responsáveis pela remoção do óleo em presença de biossurfactantes (PARIA, 2008; VREYSEN & MAES, 2005; ANG & ABDUL, 1991; PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011): (i) o mecanismo de mobilização (*mobilisation mechanism*), atribuído à capacidade dos agentes de superfície em reduzir a tensão superficial e interfacial entre os sistemas de ar/água e do solo/água; (ii) o mecanismo de solubilização, que envolve a incorporação de óleo no interior das micelas de surfactante. Enquanto o primeiro mecanismo ocorre em concentrações iguais ou inferiores a CMC, concentrações elevadas, inclusive muitas vezes superiores a CMC, são necessárias para que o mecanismo de solubilização desempenhe papel principal na remoção do óleo (WARD, 1995). Ademais, são muitas as condições que devem cumprir-se para que a solubilização ganhe importância: a relação de óleo/tensoativo na micela, a cinética de incorporação do óleo as micelas, entre outros (CARROLL, 1993). Como a solubilização é um fenômeno controlado pela difusão, a velocidade de solubilização aumenta a números elevados de Reynolds (VERMA & KUMAR, 1998).

Levando em consideração os aspectos comentados, considera-se que as concentrações de biossurfactante empregadas nos ensaios de remediação provavelmente não são suficientes para permitir que grandes quantidades de óleo sejam “solubilizadas” no interior das micelas. Outro aspecto a ser levado em conta na solubilização é o tempo de contato entre a solução de tensoativo e a areia contaminada, que no caso da presente pesquisa,

foi baixo devido aos valores de Reynolds em que se trabalham (regime laminar, $Re = 1.49$). Sendo assim, considera-se que o mecanismo de solubilização não contribuiu de forma significativa ao processo de remoção do contaminante aderido a superfície da areia. Nas condições experimentais ensaiadas, atribui-se fundamentalmente aos fenômenos de redução de tensão interfacial (mecanismo de mobilização) a descontaminação do solo. O efeito positivo da concentração do biossurfactante sobre a redução de tensão interfacial possibilita que a solução penetre mais facilmente nos poros do leito de areia e arraste maiores quantidades de óleo.

Vale ressaltar que não houve emulsificação do óleo durante o processo. Este fato deve-se a falta de turbulência (número de Reynolds equivalente a regime laminar) e as baixas concentrações de biossurfactante empregadas nos ensaios (ver Tabela 18, dados de índice de emulsificação), que dificultam a formação de emulsões estáveis. De acordo com dados da literatura aqui relatados, todos estes aspectos podem ser benéficos, já que além de facilitar o processo de separação do óleo a partir da água residual produzida durante a remediação, derivam em processos mais econômicos.

A capacidade de remediação de solos contaminados utilizando lipopeptídeos estudada neste trabalho também foi avaliada em outros estudos com diferentes hidrocarbonetos. Das e Mukherjee (2007) ao realizarem estudos de MEOR in situ usando uma coluna de areia empacotada, descobriram que *B. subtilis* foi eficaz na recuperação de óleo da areia dos poros. Pornsunthorntawee e colaboradores (2008) descobriram que lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* exibiram eficiência de recuperação de petróleo de $61,62 \pm 0,03\%$. Assim, as diferenças nos valores de eficiência de remoção relatado nessas obras podem ser atribuídas às características próprias do processo de lavagem, dos solos e dos hidrocarbonetos.

5.7. Ensaio de Biodegradabilidade

Dois tipos de ensaios foram realizados para avaliar a biodegradabilidade do biossurfactante produzido. O primeiro foi utilizando o micro-organismo *Pseudomonas putida*, e o segundo teste realizado foi o denominado "Método estático" utilizando como inóculo uma pequena quantidade de micro-organismos aeróbios, procedentes de uma população mista e

aerada proveniente de uma estação depuradora de águas residuais urbanas “UTE EDAR GRANADA SUR” (Granada – Espanha).

5.7.1. Biodegradabilidade do biossurfactante produzido por ICA 56 por *Pseudomonas putida*

Os testes de biodegradabilidade por *Pseudomonas putida* foram realizados mediante contato da bactéria com biossurfactante em presença de uma solução de nutrientes de composição pré-estabelecida. A biodegradabilidade final do biotensoativo é acompanhada mediante medidas do carbono total dissolvido ao principio (tempo zero) e ao final do experimento (72 horas).

Uma das principais vantagens do uso de ensaios de biodegradabilidade com *P. putida* como bioindicador está no fato de que o micro-organismo em questão encontra-se normalmente disponível no processo tradicional de tratamento de efluentes líquidos conhecido como lodos ativados (JURADO *et al.*, 2013). Outro aspecto a ser levado em conta é o tempo de realização do mesmo (apenas 3 dias).

A Figura 21 representa a porcentagem de eficiência da biodegradação versus concentração de biossurfactante, após 72 horas de ensaio. Para concentrações de até 100 mg/L, a Figura 21 mostra que os valores de eficiência de degradação do biotensoativo são superiores a 65%. Para o intervalo de concentrações de 100 a 200 mg/L, observa-se um drástico decréscimo da eficiência da biodegradabilidade, chegando alcançar valores ligeiramente superiores a 10% (200 mg/L).

Analisando-se os dados experimentais observa-se uma clara relação entre eficiência de biodegradabilidade e concentração inicial do tensoativo, sendo que os maiores valores de biodegradabilidade são obtidos em concentrações relativamente baixas do bioproduto. Dentre os ensaios realizados, somente aqueles cuja com concentração é superior a 100 mg/L não alcançam valores de eficiência de biodegradação superiores ao 50%.

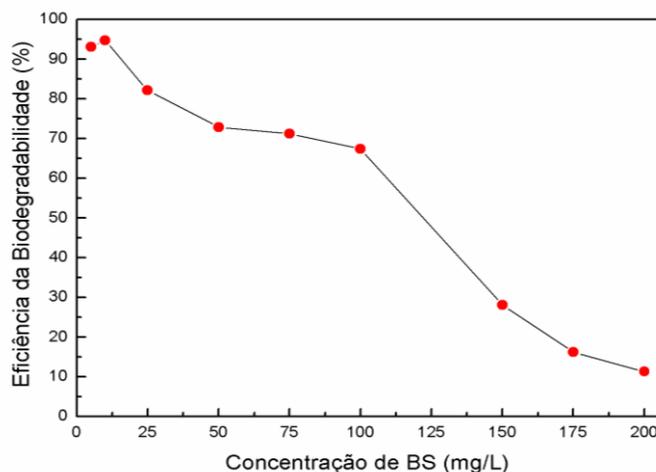


Figura 21 - Eficiência da biodegradabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 realizados com *P. putida*.

O parâmetro mais importante nesse tipo de teste é o de B50, ou seja, a concentração em que ocorre 50% de biodegradação do composto. Neste caso, o valor de B50 para o lipopeptídeo produzido por *B. subtilis* ICA56 corresponde a 122,1 mg/L. Levando em conta que não existem trabalhos publicados na literatura sobre a biodegradabilidade de lipopeptídeos por *Pseudomonas putida*, se estabelecerá uma comparação com os trabalhos desenvolvidos com surfactantes sintéticos. Neste sentido, Jurado e colaboradores (2013) estudaram a biodegradabilidade de diferentes óxidos de amina (tensoativos comerciais não iônicos amplamente utilizados em detergentes e produtos de cuidado pessoal) mediante ensaios com *P. putida*. Os resultados experimentais deste trabalho indicam que somente nos ensaios realizados com concentrações inferiores a 30 mg/L obteve-se valores de eficiência de biodegradação superiores ao 50%

Lechuga e colaboradores (2012) também estudaram a biodegradabilidade de tensoativos não iônicos (óxidos de amina) submetidos a um processo prévio de ozonização. Os autores relataram que a ozonização exerceu um pequeno efeito positivo sobre a biodegradabilidade dos mesmos, uma vez que o ozônio atua modificando a estrutura química do tensoativo e, portanto, suas propriedades interfaciais. Como consequência, observaram-se valores de eficiência de biodegradabilidade superiores nos testes realizados com tensoativos previamente submetidos a processos de ozonização. Em linhas gerais, os valores de 50% de biodegradabilidade foram obtidos em concentrações próximas aos 25 mg/L.

Comparando-se os resultados de biodegradabilidade obtidos neste trabalho com os relatos por Lechuga e colaboradores (2012) e Jurado e colaboradores (2013), verifica-se que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 apresenta valores de B50 várias vezes

superior ao dos surfactantes comerciais testados (25 a 30 mg/L frente a 122 mg/L). O teste com bioindicador aponta para um perfil que leva a crer em elevada biodegradabilidade do biossurfactante estudado.

5.7.2. Biodegradabilidade do biossurfactante por bactérias presentes em água de estação de tratamento de esgoto: Método Estático

O método estático (Normas UNE 55523:1990 e UNE 55844:1991) é amplamente utilizado para a determinação da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos e não iônicos contidos em detergentes. O método está baseado em por em contato uma pequena quantidade de micro-organismos aeróbios presentes em solução nutriente adequada para o crescimento microbiano (composição química definida) com uma solução que contém o composto cuja biodegradabilidade deseja-se determinar.

Neste trabalho o método estático foi utilizado com a finalidade de avaliar a biodegradabilidade dos biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* ICA6 frente a uma população de micro-organismos mista e aerada. As concentrações de biotensoativo testadas foram as seguintes: 0 (Controle/Branco), 10, 25, 50, 100 e 200 mg/L. A Figura 5.19 mostra a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) ao longo do tempo do ensaio para as diferentes concentrações de biotensoativo testadas. A Figura 22 representa a porcentagem de biodegradação final ao longo do tempo para os testes realizados com o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56.

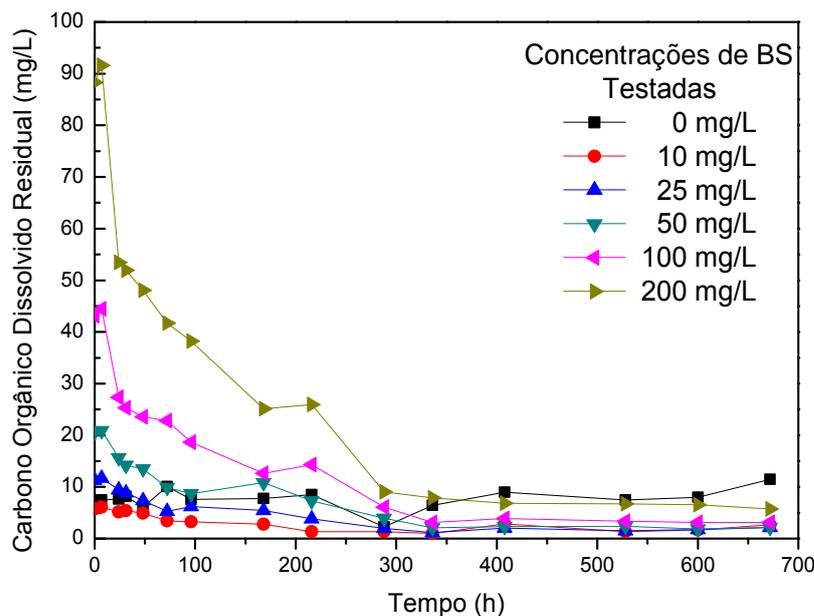


Figura 22 - Carbono Orgânico Dissolvido Residual (COD) para teste de biodegradação do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 para diferentes concentrações testadas utilizando como inóculo uma população aerada e mixta.

Pode-se verificar que na maior concentração de biossurfactante testada (200 mg/L) bem como em todas as demais concentrações avaliadas, a quantidade de carbono orgânico dissolvido é inferior a 10 mg/L em 336 horas (14 dias de experimento), demonstrando que o biossurfactante avaliado é altamente biodegradável.

A Figura 23 representa a porcentagem (%) de Biodegradação Final para testes realizados com o biossurfactante produzido por ICA56.

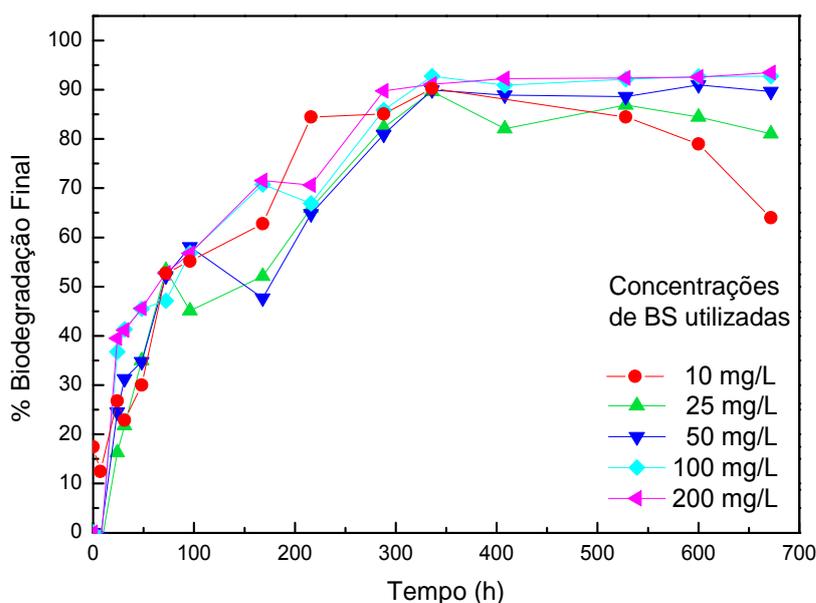


Figura 23 - Biodegradação final (%) do biossurfactante produzido por ICA56 para diferentes concentrações testadas utilizando como inóculo uma população aerada e mixta.

Analisando-se a Figura 23 é possível verificar que os maiores valores de biodegradabilidade são obtidos nos experimentos realizados com elevadas concentrações de biossurfactante. Ao final do teste (28 dias), praticamente não existem diferenças entre os valores de biodegradabilidade última obtidas nos ensaios realizados com 100 e 200 mg/L (92.74 e 93.5 %, respectivamente). Para facilitar a compreensão do fenômeno, apresenta-se na Tabela 5.13 os parâmetros característicos (JURADO *et al.*, 2007) relacionados ao perfil da curvas de biodegradabilidade. O tempo de meia vida é definido como o tempo requerido para que a concentração do substrato se reduza a metade de seu valor inicial. A velocidade média é determinada como o quociente entre o porcentagem de biodegradabilidade última de 50% e o tempo necessário para alcançar dita porcentagem de biodegradação. Por último, a porcentagem de biodegradação é calculada a partir da concentração de carbono orgânico total inicial e do carbono orgânico total final.

Tabela 22 – Parâmetros característicos dos perfis de biodegradabilidade para o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56.

Parâmetro	Concentração de biossurfactante (mg/L)					
	0	10	25	50	100	200
COD_i	7,21	5,74	11,3	20,68	43,16	88,32
COD_f	11,45	2,69	2,14	2,14	3,13	5,76
t_{1/2}, dia	---	7,00	7,00	3	3,17	2,92
V_m, %/dia	---	7,14	7,14	16,67	15,79	17,14
B_{iod}, %	---	53,15	81,04	89,65	92,75	93,48

Tal e como pode-se verificar na Tabela 22, existe uma relação de dependência entre a concentração residual (COD_f) e a concentração inicial de tensoativo (COD_i). Os maiores valores de concentração residual correspondem aos ensaios em que a concentração inicial do bioproduto era maior. Adicionalmente observa-se que a velocidade média de biodegradação (V_m) aumenta com o incremento de concentração do biossurfactante, em concordância com a diminuição do tempo de meia vida, diferente do que acontece com ensaios utilizando tensoativos sintéticos disponíveis na literatura, onde o aumento da concentração de surfactante diminui a velocidade média de biodegradação (V_m). Tal resultado indicou que no intervalo de concentrações avaliado, não existe inibição das bactérias pelo substrato (agente de superfície) o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56.

Apesar do crescente interesse pela biodegradabilidade de compostos recalcitrantes em presença de biossurfactantes, na atualidade não existem trabalhos publicados na literatura centrados na biodegradabilidade de biossurfactantes pelo Método Estático. Por outro lado, são muitas as pesquisas dedicadas a avaliação da biodegradabilidade de surfactantes sintéticos.

A modo de comparação, destacam-se as pesquisas realizadas por Jurado e colaboradores (2012; 2013) em estudos de biodegradabilidade com tensoativos sintéticos comerciais, cujos resultados são opostos aos obtidos no presente trabalho. Durante a avaliação da biodegradabilidade de tensoativos comerciais (ácidos alquil éter carboxílicos, Akypo®), Jurado e colaboradores (2012) verificaram que a velocidade de biotransformação do tensoativo diminuiu quando a concentração inicial do mesmo foi incrementada. Em outras palavras, um aumento na concentração do bioproduto derivou em tempo de vida média do surfactante superior. Outro aspecto importante a destacar deste trabalho é o efeito do tamanho da cadeia carbonada do tensoativo sobre a biodegradabilidade. Jurado e colaboradores (2012; 2013) observaram que, quando o tensoativo testado apresentava uma cadeia alquílica menor, a porcentagem de biodegradação aumentava com a concentração inicial. Neste estudo, independentemente do tamanho da cadeia carbonada, os tensoativos analisados somente foram capazes de cumprir com a normativa vigente (Norma Européia EC 648/2004, mínimo de 60% de biodegradação) em concentrações de apenas 25 mg/L.

Jurado e colaboradores (2013) também realizaram estudos de biodegradabilidade usando alquilpoliglucósidos, alcóois graxos etoxilados, entre outros. Os resultados obtidos nestes experimentos são similares aos apresentados por Jurado e colaboradores (2012). Novamente constatou-se que a biodegradabilidade depende da concentração inicial do tensoativo, sendo esta é maior para concentrações menores de tensoativos.

Tensoativos são considerados biodegradáveis quando apresentam níveis de biodegradabilidade em torno de 60% em um período de 28 dias, no entanto para aceitar um tensoativo como biodegradável, este deve ser degradado a nível de 80% em 19 dias de ensaio (Ruiz, 2010). Assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstram claramente que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 pode ser considerado uma substância altamente biodegradável.

5.8. Toxicidade do biossurfactante produzido por ICA 56 em organismos aquáticos

5.8.1. Toxicidade do biossurfactante em microalga (*Selenastrum Capricornutum*)

A toxicidade do biossurfactante produzido por ICA56 foi avaliada através da medida da inibição do crescimento da microalga de água doce *Selenastrum capricornutum*. O ensaio foi realizado a 23 ± 2 °C com auxílio do kit comercial ALGALTOXKIT F™.

Para tal, colocaram-se em contato soluções de diferentes concentrações do biossurfactante (preparadas em meio de cultivo) e a microalga ($1 \cdot 10^6$ algas/mL), e acompanhando-se o grau de inibição do crescimento da microalga mediante medida da absorbância (670 nm) a diferentes tempos (0, 24, 48 e 72 horas) do experimento.

A Tabela 23 apresenta os resultados dos ensaios de ecotoxicidade: os valores de concentração de biossurfactantes testadas, a porcentagem de inibição do crescimento obtida, assim como logaritmo da concentração de BS necessária para cálculo da EC_{50} .

Tabela 23 - Concentrações de biossurfactante (mg/L) produzido por *B. subtilis* ICA56 utilizadas para ensaios de toxicidade em algas, % inibição encontradas e Log da concentração de BS.

Concentração mg/L	% Inibição	Log(C_{BS})
300	66,31	2,4771
200	62,74	2,3010
100	57,27	2,0000
50	46,27	1,6990
25	38,63	1,3979

Representando um gráfico % inibição versus Log da concentração do biotensioativo utilizada, obtém-se uma reta, sendo possível calcular a IC_{50} . Obtém-se "Y" a partir da equação da reta encontrada e o inverso de Log do valor encontrado para "Y" é a IC_{50} (Figuras 24 e 25).

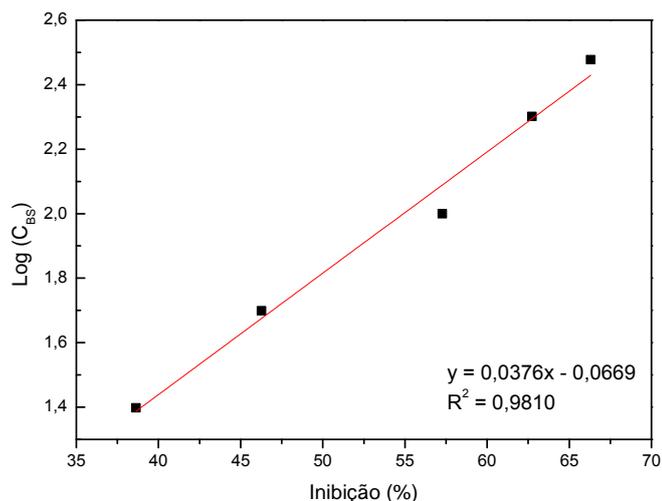


Figura 24 - Linearização entre a % de inibição e Log da concentração de biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 testada para avaliação da toxicidade em microalgas do tipo *Selenastrum capricornutum*.

$$Y (50\% \text{ inibição}) = 1,8131$$

$$\text{Inverso de Log para } y = EC_{50}$$

$$IC_{50} (\text{mg/L}) = 65,03$$

Para fins de comparação, o mesmo teste foi realizado com um tensoativo químico comercial, a saponina (Sigma Aldrich) a fim de comparar o comportamento do biotensoativo excretado pelo micro-organismo ICA56 e um tensoativo comercial frequentemente utilizado. Existem poucos estudos com biotensoativos para que se possa compará-los devido especialmente o pouco uso dos mesmos a nível industrial.

Na Tabela 24 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 24 - Concentrações de saponina (mg/L) utilizadas para ensaios de toxicidade em algas, % inibição encontradas e Log da concentração de saponina.

Concentração mg/L	% Inibição	Log(C _S)
90	61,61	1,9542
70	65,65	1,8451
50	56,28	1,6990
30	39,99	1,4771
10	31,95	1,0000

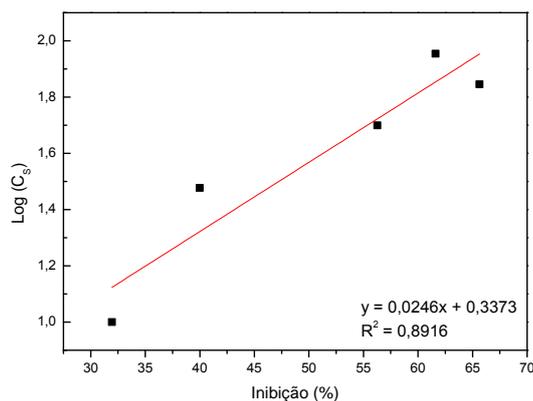


Figura 25 - Linearização entre a % de Inibição e Log da concentração de Saponina (Sigma Aldrich) testada para avaliação da toxicidade em microalga do tipo *Selenastrum capricornutum*.

$$Y (50\% \text{ inibição}) = 1,5673$$

$$\text{Inverso de Log para } y = EC_{50}$$

$$IC_{50} (\text{mg/L}) = 36,92$$

Normalmente, as concentrações de tensoativo presentes no meio, são abaixo da CMC. Para o biossurfactante produzido por ICA56, a IC_{50} encontrada foi três vezes o valor da CMC, portanto pode-se considerar seu uso seguro, uma vez que não serão aplicados valores maiores que a CMC. Paixão e colaboradores (2002) ao avaliarem a toxicidade aguda do dodecil sulfato de sódio (DSS) para a microalga *Tetraselmis chunii*, durante 96 horas de exposição, obtiveram valores médios de IC_{50} de 11,21mg/L a 21,87mg/L, encontrados através do percentual de inibição do crescimento das microalgas. A IC_{50} é definida como a concentração inibitória a 50% de organismos-teste, utilizada para a análise de ensaios com medidas de dados contínuos, assim como a reprodução. Ruíz (2010), ao avaliar a toxicidade de uma gama de tensoativos químicos do tipo ácidos alquil éter carboxílicos em microalgas do tipo *Selenastrum capricornutum*, obteve concentrações de IC_{50} para AKYPO RLM-25, AKYPO RLM-100, AKYPO LF1 e AKYPO LF2 de 7,08 mg/L, 26,01 mg/L, 76,42 mg/L e 76,26 mg/L respectivamente enquanto para AKYPO LF4 e AKYPO LF6 encontrou valores de EC_{50} de 331,89 mg/L e 750 mg/L, respectivamente. Ruíz (2010) observou ainda que as microalgas foram os organismos menos sensíveis aos efeitos tóxicos para a maioria dos tensoativos puros ensaiados, com uma faixa de IC_{50} entre 7,08 e 1112,93 mg/L.

5.8.2. Toxicidade do biossurfactante ao microcrustáceo *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade do biossurfactante ao microcrustáceo *Daphnia magna* foram realizados de acordo com a Norma UNE-EN ISO 6341:2013, mediante emprego do Kit DAPHTOXKIT F™. O teste é realizado a 20°C e tem uma duração de 24 horas. A avaliação da toxicidade é realizada primeiramente mediante análise visual das placas, e a continuação, pela determinação do efeito inibitório (%). Realizaram-se os mesmos experimentos usando a saponina (Sigma Aldrich), um biossurfactante comercial derivado de planta, para efeitos de comparação sobre o efeito tóxico de ambos.

A Tabela 25 relaciona os valores de concentração dos agentes de superfície com a porcentagem de efeito inibitório. O procedimento de cálculo para a determinação do efeito inibitório, assim como a determinação do parâmetro IC₅₀, encontram-se descritos no capítulo de Materiais e Métodos. O valor de IC₅₀ corresponde a concentração do tensoativo (em mg/L) que produz a imobilização de 50% da população depois de 24 horas de exposição ao tóxico.

Tabela 25 - Efeito inibitório (%) do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 e da saponina realizados em microcrustáceo da espécie *Daphnia magna*.

Concentração do biossurfactante (mg/L)	Efeito inibitório (%) para o lipopeptideo	Efeito inibitório (%) para a saponina
800	100	100
400	95	95
200	40	65
100	15	65
50	5	0
25	5	0

A partir dos dados apresentados na Tabela 5.16, obtiveram-se valores de IC₅₀ de 170,09 e 128,44 mg/L para os ensaios realizados biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 e saponina, respectivamente. Deste modo, os valores de IC₅₀ indicam que o biossurfactante estudado neste trabalho é menos tóxico que a saponina.

Levando em conta que a CMC do biossurfactante estudado é cerca de 20 mg/L a 25 °C e que sua IC₅₀ é quase dez vezes o valor de sua CMC, os valores de ecotoxicidade indicam que este não deverá causar um problema ambiental, sendo assim, considerado seguro.

Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil)

Mitra e Dungan (1997) ao estudarem as propriedades micelares da saponina Quillaja (efeitos da temperatura, sal, e pH em soluções) obtiveram valores de CMC entre 0,5 e 0,8 g/L a temperaturas de 298K e 325K, respectivamente. Sendo assim, tomando como base a CMC da saponina Quillaja, observa-se que o valor de concentração correspondente a sua IC₅₀ está abaixo da sua CMC.

Hoedges e colaboradores (2006) determinaram os valores de IC₅₀ para o LAS (tensoativo aniônico amplamente utilizado), sendo que este valor variou entre 53 e 0,67 mg/L, dependendo do tamanho da cadeia carbonada. Ribosa (1993) estudou a ecotoxicidade do nonilfenol etoxilado ao microcrustáceo *Daphnia magna*, obtendo valores de IC₅₀ entre 2,5 e 19,1 mg/L, dependendo do número de unidades de óxido de etileno presentes na molécula do tensoativo. Jurado *et al.* (2012a) avaliou a ecotoxicidade de para alquilpoliglucósidos, sendo que os valores de IC₅₀ variaram entre 29 e 111 mg/L. Villegas-Navarro *et al.* (1999) determinaram a toxicidade aguda do DSS para o microcrustáceo *Daphnia magna*, e obtiveram a CL50 entre 14,5mg/L e 16,2mg/L. Romanelli (2004) ao avaliar a toxicidade aguda e crônica dos surfactantes dodecil sulfato de sódio (DSS) e alquil benzeno sulfonado lineare (LAS), verificou que o DSS apresentou elevada toxicidade aguda ao organismo *Daphnia similis*, tanto em 24 horas (11,81%) como em 48 horas (5,21%) de exposição.

De acordo com os resultados de ecotoxicidade publicados com surfactantes comerciais e *Daphnia magna*, verifica-se que tanto o biossurfactante produzido por ICA56 quanto a saponina, apresentam valores de toxicidade muito inferiores aos obtidos para os surfactantes sintéticos, como indica o parâmetro IC₅₀.

5.8.3. Toxicidade do biossurfactante em bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177

A toxicidade do biossurfactante também foi avaliada mediante a Norma UNE-EN ISO 11348-2:2009, utilizando a bactéria marinha *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177. Neste caso, a medida da toxicidade baseia-se na inibição da intensidade luminosa da bactéria marinha depois de um determinado tempo de exposição com a substância tóxica em análise.

Como parâmetros de análise calculam-se os fatores EC₂₀ e EC₅₀, cujos que valores correspondem a concentração do agente de superfície (em mg/L) capaz de produzir uma

inibição da atividade das bactérias de 20 e 50% , respectivamente, depois do contato de 15 e 30 minutos com o tóxico. Os valores de EC₂₀ e EC₅₀ são determinados a partir da função Gama, sendo esta um indicador da atividade enzimática (RIBÓ, 1992). Para fins de comparação, os mesmos ensaios realizados com o biossurfactante ICA56 foram repetidos com a saponina, sendo esta biossurfactante comercial de planta (*Quillaja Bark saponin*), avaliado como GRAS safety.

As Figuras 26 e 27 (EC₅₀ 15 min e EC₅₀ 30 min) representam os dados do logaritmo Gama versus o logaritmo da concentração do biossurfactante. A equação que relaciona ambos (log Gama e log C) é usada para cálculo da EC₂₀ e EC₅₀. Os pontos experimentais representados em ditas figuras correspondem ao valor médio de duas réplicas.

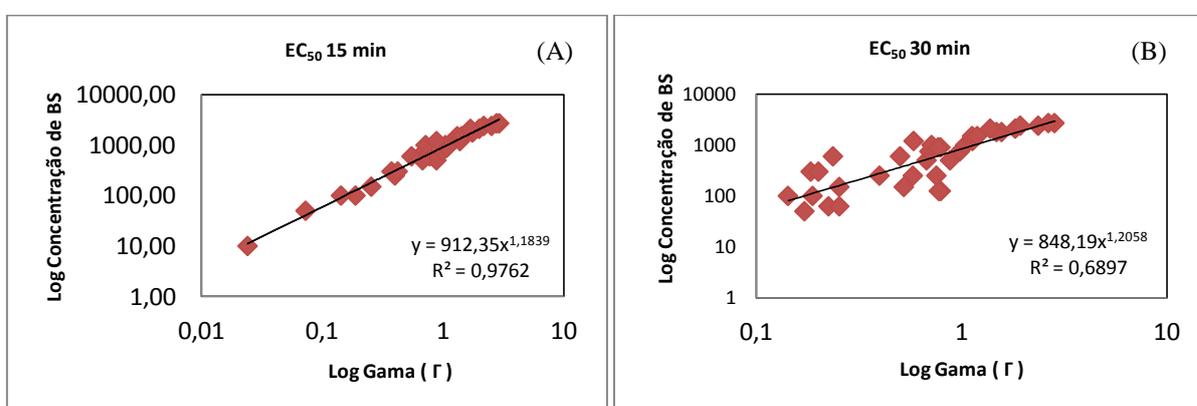


Figura 26 - Representação gráfica de Log de Gama versus Log da concentração de biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56 testado com o micro-organismo luminescente *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177: (A) 15 minutos e, (B) 30 minutos de exposição.

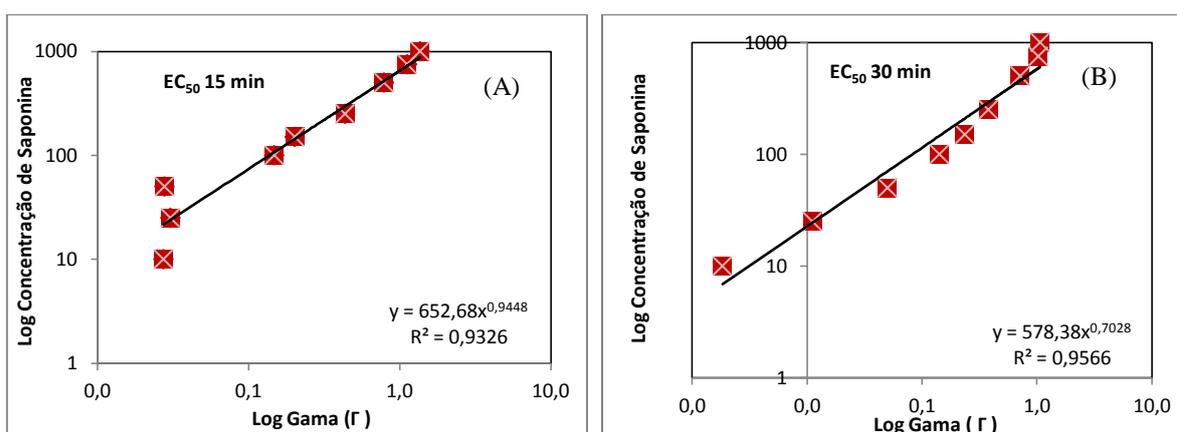


Figura 27 - Representação gráfica de Log de Gama versus Log da concentração de saponina testado com o micro-organismo luminescente *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177: (A) 15 minutos e, (B) 30 minutos de exposição.

A Tabela 26 apresenta os valores de EC₂₀ e EC₅₀ para os dois surfactantes ensaiados. É possível verificar que os valores de toxicidade expressados através de EC₂₀ e EC₅₀ são alcançados para concentrações de biossurfactante elevadas. Tal resultado evidencia a baixa toxicidade de ambos surfactantes, e em particular, do biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA56. Os dados apresentados na Tabela 26 mostram que é necessário quase 1,0 g/L do biossurfactante para que o biossurfactante produzido cause 50% de inibição na atividade enzimática da bactéria, sendo este valor de concentração correspondente a 50 vezes a sua CMC.

Tabela 26 - Resultados dos testes de toxicidade aguda realizado com *Vibrio fischeri*.

Surfactantes testados	EC ₂₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	EC ₂₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)
	(15 min.)	(15 min.)	(30 min.)	(30 min.)
BS* produzido por <i>B. subtilis</i> ICA56	176,76	912,35	159,42	848,19
Saponina	176,31	652,68	218,32	578,38

*BS: biossurfactante.

Um dos tensoativos comerciais mais utilizados na atualidade são os sulfonatos de alquilbenzeno lineal (LAS). Estudos realizados por Lechuga (2005) e Perales (2001) demonstram que o mesmo apresenta valores de toxicidade de EC₅₀ (15 minutos) de 27,58 a 35,95 mg/L, sendo este referido como um surfactante de toxicidade intermediária.

Lima e colaboradores (2011) estudaram a toxicidade de três biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*, cujas CMC variam entre 150 e 200 mg/L, empregando diferentes tempos de exposição da bactéria ao tóxico (5, 15 e 30 minutos). A inibição na atividade enzimática da bactéria devida a toxicidade dos biossurfactantes foi determinada mediante acompanhamento da luz emitida, posto que esta é diretamente proporcional a atividade metabólica da bactéria (Jennings e colaboradores, 2001). Os resultados experimentais mostraram que, para um tempo de exposição de 30 minutos, o valor do parâmetro EC₂₀ variou entre 322,5 e 523,0 mg/L. Para fins de comparação, os pesquisadores também avaliaram a toxicidade do tensoativo comercial SDS, apresentando um valor de EC₂₀ aos 30 minutos de 25,27 %, sendo que o mesmo foi considerado tóxico as bactérias, tornando evidente a baixa toxicidade dos biossurfactantes avaliados. Neste sentido, destaca-se que os resultados

experimentais obtidos por Lima e colaboradores se aproximam (em ordem de magnitude) aos obtidos no presente trabalho.

Jurado e colaboradores (2012) avaliaram a toxicidade de três alquilpoliglucósidos com diferentes tamanhos de cadeia alquílica e graus de polimerização. Os valores de EC₅₀ obtidos com 15 min de exposição variaram entre 14 e 29 mg/L para os testes com *V. fischeri*, sendo que a toxicidade do surfactante está relacionada como o comprimento da cadeia alquilo, como resultado do aumento da hidrofobicidade (JURADO *et al.*, 2012).

Os efeitos tóxicos dos agentes de superfície sobre as bactérias podem ser explicados pela interação surfactante – lipídeos presentes na membrana celular. De acordo com Gloxhuber (1980), dependendo da concentração empregada, os surfactantes são capazes de “solubilizar” a membrana celular, provocando uma ação bactericida sobre as células. Outro aspecto a ser levado em conta são as interações entre a molécula do surfactante e as proteínas essenciais para a função celular (JENSEN, 1999).

Com base aos resultados dos testes de toxicidade realizados por diferentes pesquisadores, conclui-se que tanto o biossurfactante produzido por ICA56 quanto a saponina apresentam baixos valores de toxicidade, uma vez que os parâmetros EC₂₀ e EC₅₀ são obtidos em valores de concentração muito elevados.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O uso de suco de caju clarificado como fonte alternativa para produção de biossurfactantes apresentou baixos resultados de produção de biossurfactante quando comparados ao meio sintético utilizado, e, portanto, evidenciando ser uma fonte de baixo poder para formação de produto. Dentre as diferentes linhagens de *Bacillus* estudadas, destacou-se *B. subtilis* ICA 56 isolada do solo de manguezal de Icapuí, Ceará – Brasil. O biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 apresentou um importante poder de redução das tensões superficial e interfacial, com valores de $28,20 \pm 0,07$ mN/m (25 °C) e $05,26 \pm 0,08$ mN/m (3xCMC, 65 °C). Os valores de tensão interfacial (solução de biossurfactante frente à dodecano) diminuem com o aumento de temperatura (intervalo de 25 a 65 °C) e de concentração do bioproduto (20, 40 e 60 mg/L de biossurfactante). No entanto, somente a variação da concentração do biossurfactante exerce um efeito significativo sobre a tensão interfacial. A concentração micelar crítica do biosurfactante foi determinada a diferentes temperaturas (25, 45 e 65 °C), sendo que seus valores variaram entre $0,017 \pm 0,002$ g/L (25°C) e $0,031 \pm 0,008$ g/L (65°C). Tanto os valores de tensão superficial, tensão interfacial e CMC estão acordo com o que reporta a literatura.

Verificou-se que o aumento de concentração do biossurfactante (20, 40 e 60mg/L) repercute em uma redução significativa nos valores de ângulo de contato entre soluções de biossurfactante e Parafilm® a 25 °C (de $104,37 \pm 4,31$, a 25 °C, para $92,07 \pm 1,55$, a 65 °C).

Mediante análises de FTIR e MS, o biossurfactante foi identificado como o lipopeptídeo do tipo surfactina, uma vez que os espectros obtidos para o biotensoativo produzido por *B. subtilis* ICA 56 e para a surfactina padrão (Sigma Aldrich) apresentaram perfis semelhantes.

Em testes qualitativos, visualizou-se eficiente degradação de petróleo e misturas de óleos de girassol e de oliva (virgem e usado) por *B. subtilis* ICA 56.

Nos ensaios de remediação de solos contaminados com óleo lubrificante, os resultados experimentais mostram que ambos fatores estudados, temperatura e concentração de biosurfactante, afetam de forma positiva (e significativa) a remoção do óleo lubrificante aderido a areia. Os valores elevados de eficiência de remoção do contaminante (em torno de 85%) foram obtidos usando uma solução com 60 mg/L do biossurfactante e uma temperatura de 65 °C. Tais resultados evidenciam o potencial de aplicação do biosurfactante a recuperação

de solos, viabilizando um processo eficiente e econômico. Por outro lado, os dados obtidos também sugerem o seu uso em processos de recuperação de petróleo.

O biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 apresentou alta biodegradabilidade, sendo degradado tanto por bactérias presentes em águas de efluentes residuais (população mista e aerada proveniente de uma depuradora da cidade de Granada – Espanha), como por *Pseudomonas putida*, uma bactéria indicada em normas nacionais e internacionais para testes de avaliação de degradação de diversas substâncias químicas. Nos testes de biodegradação realizados com *Pseudomonas putida*, o parâmetro B50 (equivalente a 50% de biodegradação) corresponde a uma concentração de 122,1 mg/L de biossurfactante, levando a crer que o biossurfactante produzido no presente estudo é altamente biodegradável, uma vez que sua CMC é em torno de 20 mg/L (25 °C). Os resultados dos ensaios de biodegradabilidade indicam que o biossurfactante em questão encontra base de aplicação em diferentes setores industriais, como por exemplo, na formulação de detergentes para usos específicos, onde faz-se necessário a adição de surfactantes sem que haja comprometimento do meio ambiente.

Utilizando-se bactérias presentes em águas de efluentes residuais, observou-se que, para todas as concentrações testadas (de 10 a 200 mg/L), as porcentagens de degradação do biossurfactante superaram os 50% e 90%, para ensaios com duração de 100 e 300 horas, respectivamente.

O biossurfactante produzido apresentou baixos valores de ecotoxicidade frente a diferentes organismos: microalga *Selenastrum capricornutum*, o microcrustáceo *Daphnia magna* e a bactéria *Vibrio fischeri*. Os organismos testados apresentaram EC50 de 65,03 mg/L (*Selenastrum capricornutum*), 170,09 mg/L (*Daphnia magna*) e 912,35 mg/L (*Vibrio fischeri*, após 15 minutos de exposição). Deste modo, dentre os organismos avaliados, o mais sensível é a microalga *Selenastrum capricornutum*. Tais resultados apontam a aplicabilidade segura do biossurfactante produzido por ICA56 na resolução de problemas ambientais, tais como acidentes de derramamento de óleo no mar.

Os resultados dos testes de biodegradabilidade e toxicidade confirmam a compatibilidade ambiental do biossurfactante, sendo que os valores obtidos em ditos testes foram sempre mais favoráveis quando comparados aos relatados em literatura para surfactantes sintéticos.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* ICA 56 apresentou excelentes propriedades físicas e químicas,

evidenciando eficiência nos ensaios de remediação de solos (areia contaminada com óleos lubrificantes) bem como compatibilidade ambiental, apresentando baixos valores de toxicidade e altos valores de biodegradabilidade. Com isso, o biossurfactante produzido no presente estudo é evidenciado como um promissor agente de superfície, com possibilidades amplas de aplicação. O mesmo poderia ser utilizado como componente em formulações de detergentes, em produtos cosméticos e desinfetantes, produtos de uso na agricultura, na recuperação terciária do petróleo, dentre outras aplicações.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"*Daphnia magna*". Integrated Taxonomic Information System. Straus, 1820; Taxonomic Serial No.: 83884.

"Espectrometria de Massa". TrabalhosFeitos.com. 09/2013. <<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Espectrometria-DeMassa/38896399.html>> PUC-Rio - Certificação Digital N° 0124802/CA. Acessado em 14.06.2014.

ABD-ALLAH, AMA. Determination of long chain alkylbenzenes in sediment samples from Alexandria Coast, Egypt. *Toxicol. Environ. Chem* 47:83–88, 1995.

ABDEL-MAWGROUND, A. M.; LÉPINE, D. E.; Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 86, p. 1323 – 1336, 2010.

ABEL, P. D. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J Fish Biol.*, v. 6, p. 279 - 298, 1974.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v. 223, p. 143–151, 2008.

ABREU, F. A. P. DA SILVA NETO, R. M. Cajuína. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 59 p. ; il. - (Coleção Agroindústria Familiar). ISBN 978-85-7383-396-6, 2007.

ACCORSINI, F. R. Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). **Universidade Estadual Paulista**, Jaboticabal, 2010.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb Technol* v. 27, p. 749-754, 2000.

AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, v. 6, n. 17, 2007.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; & AL-SULAIMANI, H. S. 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.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, G. 27p., 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, G. 27p., 2004.

ALTMAJER VAZ, D., GUDIÑA, E.J., JURADO ALAMEDA, E., 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.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25(17), p. 3389 - 3402, 1997.

ALVES, O. L. "Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier: Feliz combinação de velhos conhecimentos de óptica, matemática e informática." Unicamp, Campinas, 2009.

ANG, C.C.; ABDUL, A.S. Aqueous surfactant washing of residual oil contamination from sandy soil. **Ground Water Monitoring Rev.**, Spring, p. 121-127, 1991.

ANKLEY, G. T.; BURKHARD, L. P. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ Toxicol Chem.*, v. 11, p. 1235 - 1248, 1992.

ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: P. A., ZAGATTO, & E., BERTOLETTI (eds.), *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*, São Carlos: Editora Rima, p. 117-147, 478 p., 2006.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 591-594, 1993.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, 87:427-444, 2010.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANERJEE, U. C., SANI, R.K., AZMI, W., SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 213-219, 1999.

BARRETO, R. V. G. Prospecção ambiental de microrganismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) - **Universidade Estadual do Ceará**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2011.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(4): 979-985, 2008.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. In: Fundamentos de toxicologia. Avaliação da toxicidade. **São Paulo**, v.2, p. 57-68, 2003.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 1117-1125, 1991.

BASSFELD, J.C. TOXICIDADE AGUDA PARA ORGANISMOS-TESTE *Selenastrum capricornutum* PRINTZ (ALGA-CHLOROPHYCEAE) E *Daphnia magna* STRAUS (CRUSTACEA: CLADOCERA) DE CINCO AGROTÓXICOS FREQUENTEMENTE UTILIZADOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO NHUNDIAQUARA-MORRETES-PR. Tese de Doutorado, **Universidade Federal do Paraná**, 2001.

BEARE, M.H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D.A; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant Soil**, v. 170, p. 5-22, 1995.

BECHER, P. Emulsion. Theory and Practice. Second ed. Reinhold Publishing . **New York**. 1965.

BEYNON, R. J. Proteolytic Enzymes: a practical approach. New York. **Oxford University**. Press, 257 p., 1996.

BEZERRA, M. S. Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Departamento de Engenharia Química, Brasil, 2006.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, G. R.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E.R. Produção de Biotensoativo Utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) e Resíduo Agroindustrial (manipueira) como Substrato. **HOLOS**, Ano 28, v.1, 2012.

BODOUR, A.A.; GUERRERO-BARAJAS, C.; JIORLE, B.V.; MALCOMSON, M.E.; PAULL, A.K.; SOMOGYI, A.; TRINH, L.N.; BATES, R.B.; MAIER, R.M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium sp.* strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 114-120, 2004.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, **Colloids and Surfaces A**, v. 52, p. 41 – 52, 1999.

BORGES, C. N. B. F. Estudo do factor envelhecimento na classificação geográfica automática de ramos petrolíferas. Dissertação de Mestrado, **Universidade de Lisboa**, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, 115 p., 2007.

BORIN, A.; POPPI, R. J. Multivariate quality control of lubricating oils using Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4, p. 570-576, 2004.

BOYD, J. v; PARKINSON, C.; SHERMAN, P. Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 41, n. 2, p. 359-370, 1972.

BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; YEAGER, T. R.; RASLEY, B. T.; BROWN, E.G. Patterns of microbial activity and uniled sediments in Prince William Sound. In: EXXON VALDEZ. **Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium**. Bethesda: American Fisheries Society. V. 18, p. 94-108, 1996.

BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. Química Geral. Rio de Janeiro: **Livros técnicos e científicos**, 1ª edição, 1981.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. O estudo no rio Mogi-Guaçu: a abordagem metodológica. In: Limnologia fluvial. **São Paulo**, v.1, p. 15-22, 2003.

BUENO, S. M.; DA SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.* Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Química, **Universidade Federal do Paraná**, 2012.

BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: Estudos de produção e caracterização. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 82 p., 2009.

CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

CARA, A. B. Influencia de los procesos de ozonización sobre la biodegradación y toxicidad de tensioactivos no iónicos y aniónicos. Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, **Trabajo Final del Máster Universitario en Ciencia e Tecnología de Coloides y Interfases**, Universidad de Granada UGR, 2012.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488-494, 1999.

CHATURVEDI, V.; KUMAR, A. Bacterial utilization of sodium dodecyl sulfate. **International Journal of Applied biology and pharmaceutical technology.**, v. 3, p. 1126 - 113, 2010.

CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. **Journal of membrane science**, v. 299(1), p.114-121, 2007.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N., Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**. 42, 408, 1981.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and environmental microbiology**, v.47(1), p. 173-176, 1984.

CORRÊA, T. L. R. Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. Smia-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, Campos Dos Goytacazes – Rj, (Dissertação – Mestrado), 2009.

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. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Effects of ethanol versus MTBE on BTEX migration and natural attenuation in aquifer columns. **Journal of Environmental Engineering**, v. 128(9), p. 862 – 867, 2002.

DA SILVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, M. Entre esponjas e detergente (Novos produtos podem remover petróleo derramado no mar). Ed. 176, 2010.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 192-199, 2005.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants, **Process. Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties. **Bioresource Technology**, 100, 4887-4890, 2009.

DECESARO, A.; RIGON, M.R.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DESCHENES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J.P.; SAMSON, R. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 638 - 646, 1996.

DIAMANTINO, T.C.; GUILHERMINO, L.; ALMEIDA, E.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. **Ecotox Environ Safety**, v. 45, p. 253-259, 2000.

Du NOÛY, P. L. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. **The Journal of General Physiology**, v. 7(5), p. 625-633, 1925.

DUBEY, K.V. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 860-867, 2005.

ESMERALDO, F. S., Influência da Temperatura na Produção de Surfactina por *Bacillus Subtilis* LAMI005. *Monografia* (Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2010.

ETCHEGARAY, A.; DE CASTRO BUENO, C.; DE MELO, I. S.; TSAI, S. M.; DE FÁTIMA FIORE, M.; SILVA-STENICO, M. E.; DE MORAES, L. A. B.; TESCHKE, O. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. **Archives of microbiology**, V.190(6), p. 611-622, 2008.

ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D. H.; FIORE, M. F.; VON DÖHREN, H.; SIU, M. T.; NEILAN, B. A. Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA 19. **Journal of applied phycology**, V. 16(3), P. 237-243, 2004.

FARIA, A. F. Produção, Purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual. Tese de Doutorado, **Universidade Estadual de Campinas**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos Brasil, 153 p., 2010.

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 biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1951-1957, 2011.

FARRÉ, M. L.; GARCÍA, M. J.; TIRAPU, L.; GINEBREDÁ, A.; BARCELÓ, D. Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox bioluminescence inhibition assays. **Analytica chimica acta**, v. 427(2), p. 181-189, 2001.

FAVA, F.; DI GIOIA, D. Effects of Triton X-100 and quillaya saponin on the ex situ bioremediation of a chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 623-630, 1998.

FELIX, A. K. N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. 103 f. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal do Ceará**, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

FERNANDES, A. C. L. B.; PEREIRA, M. D. ; KRONEMBERGER, F. A.; FREIRE, D. M. G. Produção de biossurfactantes para aplicação em remediação de solos contaminados por Petróleo: estudo dos fatores de virulência. In: **RIO OIL & GAS Expo and Conference, 2008**, Rio de Janeiro - Rio de Janeiro. RIO OIL & GAS Expo and Conference, 2008.

FERNANDES, P. L. Produção de biossurfactantes por *Bacillus spp.* em condição anaeróbia. **Dissertação de Mestrado** (Microbiologia Agrícola) - Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **Tibtech**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**, v. 26 (3), p. 181–185, 1998.

FOGLER, H.S.; GÜRMENT, M. N. Elements of Chemical Reaction Engineering 2nd 1992.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por leveduras. **Química Nova**, v. 31(8), p. 2091-2099, 2008.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRANÇA, I. W. L. Estudo da produção e aplicabilidade de biossurfactante bacteriano produzido por cepa isolada de manguezal cearense. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal do Ceará**, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.

FRANÇA, I. W. L., APOLONIO, J. A. M., BEZERRA, D., OLIVEIRA, D. W.F., MELO, V. M., GONCALVES, L. R.B. Estudo da Aplicabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em Biorremediação *in situ*. **6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás**, SC, 2011.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I.M. Application of biological surface active compounds in remediation technologies. In: Sen, R. (Ed.), **Biosurfactants: advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 672. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 14 p., 121–134, 2010.

FREITAS DE OLIVEIRA, D. W.; LIMA FRANÇA, Í. W.; NOGUEIRA FÉLIX, A. K.; LIMA MARTINS, J. J.; APARECIDA GIRO, M. E.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34-43, 2013.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 11, p. 483-496, 2002.

GARRUTI, D. S.; CASIMIRO, A. R. S.; ABREU, F. A. P. **Processo Agroindustrial: Elaboração de Fermentado de Caju**. Comunicado Técnico on line, 82, ISSN 1679-6535. Embrap, 2003.

GIONGO, R. J. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* (Dissertação de Mestrado). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 95 p., 2006.

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.

GLOXHUBER, C. Anionic surfactants. In: **Biochemistry, Toxicology, Dermatology, Surfactants Science Series**, v. 10. Marcel Dekker, Inc., New York, 1980.

GREENE, D.W.; BUKOVAC, M. Stomatal penetration: effect of surfactants and role in foliar absorption. **American Journal of Botany**, Columbus, v.61, n.1, p.100-106, 1974.

GRIS, E. F. Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim - SC – Brasil. Tese (doutorado) - **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 2010.

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

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWANI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HAIGH, S.D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Science Total Environmental**, 185, 161-170, 1996.

HAKI, G.D., RAKSHIT, S.K. Developments in industrially importante thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1975.

HARRIS, D.C. Análise Química Quantitativa. 6^a ed. Rio de Janeiro: **LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**, 876p., 2005.

HECULANO, J., ETCHEGARAY, A. J. Biossíntese e Propriedades de Lipopeptídeos de *Bacillus subtilis* Produzidos em Meios de Cultura Alternativos. **Anais do XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas**, 2011.

HERNANDO, M. D.; EJERHOON, M.; FERNANDEZ-ALBA; A. R.; CHISTI, Y. Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water Research*, 37(17), 4091-4098, 2003.

HINZEL, W. L. Solution Chemistry of Surfactants. **Mittal, K. L. Ed. Plenum Press: New York**, 1979.

HOROWITZ, S.; CURRIE, J. K. Novel dispersants of silicon carbide and aluminum nitride. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 11, p. 637-659, 1990.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W.M. Isolation and chracterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 6 (4), p. 243-248, 1990.

HWANG, H.; ALEGRE, G. F.; BORELLY, S. I.; FLYNN, M. N. Avaliação de Toxicidade em Sedimentos do Rio Juqueri (SP) com *Vibrio fisheri* e *Hyalella azteca*. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 2, p. 18-28, 2009.

IOST, C.; RAETANO, C.G. Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções aquosas com surfatantes em superfícies artificiais e naturais. **Engenharia Agrícola**. Jaboticabal, v. 30, n.4, p. 670-680, 2010.

IQBAL, S., KHALID, Z. M., MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactant by gamma ray-induced

mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letter and Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends and Biotechnology**, Amsterdã, v. 16, n.9, p. 396-403, 1998.

JENSEN, J. Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. **Science Total Environmental**, 226, 93-111, 1999.

JURADO, E., FERNANDEZ SERRANO, M., NUÑEZ OLEA, J.; LECHUGA, M. Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters. **Journal of Surfactants and Detergents**, 10: 145 – 153, 2007.

JURADO, E.; FERNANDEZ-SERRANO, M.; NÚÑEZ-OLEA, J.; LECHUGA, M. Primary Biodegradation of Commercial Fatty-Alcohol Ethoxylate Surfactants: Characteristic Parameters. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 10, p. 145-153, 2007.

JURADO, E.; FERNÁNDEZ SERRANO, M., RÍOS, F., LECHUGA, M. Aerobic biodegradation of surfactants. In: R. Chammy, F. Rosenkranz (Eds.), **Biodegradation – Life Science**, Cap. 3, p. 63 – 81. InTech, Rijeka, 2013.

JURADO, E.; FERNANDEZ SERRANO, M.; LECHUGA, M.; RÍOS, F. (2012). Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15 (1), 1 – 7.

JURADO, E.; FERNÁNDEZ SERRANO, M.; NUÑEZ OLEA, J.; LECHUGA, M.; JIMÉNEZ, J.L.; RÍOS, F. Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and Microalgae: a comparative study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88 (2), 290 – 295, 2012a.

JURADO, E.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; OLEA, J. N.; LECHUGA, M.; JIMÉNEZ, J. L.; RÍOS, F. Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *microalgae*: a comparative study. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 88(2), p. 290-295, 2012.

KAISER, K. L. E.; PALABRICA, V. S. Photobacterium phosphoreum Toxicity Data Index. **Water Pollut. Res.**, v. 26 (9), p. 361-431, 1991.

KANDRA, L. α -amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, p. 666-667:487-498, 2003.

KHAN N.A.; ANSARI H.R.; MOBIN, M. Effect of gibberellic acid and nitrogen on carbonic anhydrase activity and mustard biomass. *Biol. Plant*, v. 38, p. 601 - 603, 1996.

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, n. 1, p. 311-318, 2011.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T. TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249 - 253, 2010.

KIRAN, S.G.; THOMAS, T.A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, 101, 2389-2396, 2010.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731-1737, 1992.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Biosurfactants and biotechnology. **Surfactant Science Series**, v. 25, p. 247-331, 1987.

KUMAR, C.G., TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LAI, C. C.; HUANG, Y. C.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167(1), p. 609-614, 2009.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LECHUGA, M. Biodegradación y toxicidade de tensioactivos. Tese de doutoramento. Departamento de Engenharia Química. **Universidade de Granada**, Espanha, 2005.

LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; FERNÁNDEZ-ARTEAGA, A.; BURGOS, A.; RÍOS, F. Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants. **Procedia Engineering**, 42, 1038-1044, 2012.

LEVISAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ZUNDA, G.; GRIGISKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1141-1146, 2004.

LEWIS, M. A. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. **Water Research**, v. 25, p. 101 - 113, 1991.

LI, H.; SCHRÖEDER, F. Surfactants-standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Water Sci Technology**, 42:391-398, 2000.

LIMA JUNIOR, G. A. Obtenção de surfactina pelo micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, **Universidade Federal do Paraná**, 48 p., 2013.

LIMA, C. J. B. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. Tese (doutorado), **Universidade Federal de Uberlândia**, programa de Pós Graduação em Engenharia Química, 2007.

LIMA, L. B. Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopetídeos em sedimentos de manguezais do Ceará. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, **Universidade Federal do Ceará**, 54 p., 2013.

LIMA, R. K. C. Estudos de Composição e Estabilidade de Emulsões Preparadas a Base de Óleo Mineral Naftênico. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, **Universidade Federal do Ceará** (UFC), Fortaleza – Ceará, 2004.

LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. Tese de Doutorado, **Universidade Federal de Viçosa**, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, 157 p., 2008.

LIMA, T. M. S.; PROCÓPIO, L.C.; BRANDAO, F.D.; LEO, B.A.; TÓTOLA, M.R., BORGES, A. C. (). Evaluation of bacterial surfactante toxicity towards petroluem degrading mocrroorganims. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957 – 2964. 2011.

LIN, S.C.; CARSWELL, SHARMA, K.S.; GEORGIU, M.M. G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 281–285, 1994.

LIU, J.; CHEN, Y.; XU, R.; JIA, Y. Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oilfield wastewater. **Indian journal of microbiology**, v. 53(2), p. 168-174, 2013.

LIU, X., REN, B.; GAO, H., LIU; M., DAI, H.; SONG, F.; ZHANG, L. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e34430, 2012.

MABROUK, S.; HASHEM, A.M.; EL-SHAYEB, N.M.A.; ISMAIL, A.S.; ABDEL-FATTAH, A.F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v. 69, p.155-159, 1999.

MADSEN, T.; PETERSEN, G.; SEIERO, C.; TORSLOV, J.; J. Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate. **American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 7, p. 929-933, 1996.

MAIER, R.M. Biosurfactant: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101–121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997a.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18: p. 37 – 42, 1997b.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Effects of Various Nutritional Supplements on Biosurfactant Production by a Strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 5, p. 11-17, 2002b.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002a.

MARTÍN, G. R. Compuestos orgánicos en las aguas. **Ingeniería Química**, v. 6, p. 159-165, 1995.

MARTINS, D.; CARBONARI, C.A.; TERRA, M.A.; MARCHI, S.R. Ação de adjuvantes na absorção e translocação de glyphosate em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*). **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.27, n.1, p.155-163, 2009.

McALLISTER, D.E.; HAMILTON, A.L.; HARVEY, B. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. **Sea Wind**, v. 11, n. 3, p.1-142, 1997.

MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GAUR, R., DARMWAL, N.S. The production of alkaline protease by *Bacillus* species isolate. **Bioresource Technology**. V. 67, p. 201-203, 1999.

MELO, C.S.; MAYORGA, R.D.; MAYORGA, I. O.; PAULA PESSOA, P.F.A. Subsídios à gestão empresarial na busca de competitividade: o caso do mel clarificado de caju. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 31, n. 4, p.1050-1058, 2000.

MENDONÇA, C.G.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; MENDONÇA, C.G. Efeitos de surfatantes sobre a tensão superficial e a área de molhamento de soluções de glyphosate sobre folhas de tiririca. **Planta Daninha**, Viçosa - MG, v.13, n.3, p.355-365, 1999.

MERCADE, M. E., MANRESA, M. A., ROBERT, M., ESPUNY, M. J., ANDRES, C., GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME): new substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 1-6, 1993.

MERHEB, C.W., CABRAL, H., GOMES, E., DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127–131, 2007.

MITRA, S.; DUNGAN, S. Micellar properties of Quillaja saponin. 1. Effects of temperature, salt and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.5, p.1587-1595, 1997.

- MOHAN, P. K., NAKHLA, G. AND YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Resource**, v. 40, p. 533-540, 2006.
- MOITA NETO, J.M. *Molhamento e ângulo de contato*. Teresina: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/Molhamento.PDF>>. março de 2006.
- MOLINA-BARAHONA, L., VEGA-LOYO, L., GUERRERO, M., RAMIREZ, S., ROMERO, I., VEGA-JARQUÍN, C., & ALBORES, A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. **Environmental toxicology**, v. 20(1), p. 100-109, 2005.
- MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments. **John Wiley & Sons, Inc.**: Hoboken, NJ.; p. 162-206, 2008.
- MORÁN, A.C., OLIVERA, N., COMMENDATORE, M., ESTEVES, J.L., SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, p. 65-71, 2000.
- MORAN, A.C.; OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9, **Biodegradation**, v.11, p. 65-71, 2000.
- MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, T.; IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. **Journal of Bacteriology**, n. 175, p. 6459-6466, 1993.
- MOYA-RAMÍREZ, I.; GARCÍA-ROMÁN, M.; HENARES-JIMÉNEZ, M.; JURADO-ALAMEDA, E.; ALTMAJER-VAZ, D. Remediación de suelos contaminados con aceite mineral mediante tensioactivos altamente biodegradables. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, in press, 2014.
- MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 479 – 489, 2005.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. Biosurfactants, Production, Properties, Applications. **Marcel Dekker Kosaric, N. (Ed.)**, New York, p. 329–371, 1993.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science** (00113891), v. 94, n. 6, 2008.

NGUYEN, T.T.; YOUSSEF, N.H.; MCINERNEY, M.J.; SABATINI, D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, v. 42, p. 1735–1743, 2008.

NIELSEN, J.; LIDÉN, G. Bioreaction engineering principles. 2nd ed., 2002.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science & Technology, v. 18, p. 252 - 259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Using Cassava Processing Effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, n.1, p. 163-172, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais – Avaliação de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biosurfactantes por *Bacillus*. **Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento**, ed. 31, 2003.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 485–489, 1990.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, growth inhibition test. OECD, Paris, França, 1984a.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 202. *Daphnia sp* reproduction test. OECD, Paris, França, 1984b.

OLIVEIRA, D. W. F. Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Ceará - UFC**, Fortaleza, Brasil, 104 f., 2010.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FELIX, A. K. N.; APOLÔNIO, J. M. A.; BEZERRA, D. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. G. Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005: Avaliação do Meio de Cultivo. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM 2011)**, Caxias do Sul – RS, 2011.

ORLANDELLI, R. C.; ALMEIDA, T. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* Sw. **VII Encontro Internacional de Produção Científica CESUMAR (VII EPCC)**, ISBN 978-85-8084-055-1, 2011.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633–654, 2011.

PAES, F. A.; HISSA, D. C.; ANGELIM, A. L.; PINTO, N. W.; GRANGEIRO, T. B.; MELO, V. M. Diversity of a chlorine-resistant *Bacillus* population isolated from a wastewater treatment station. **Water Environment Research**, v. 84(3), p. 274-281, 2012.

PAIXÃO, J. F.; NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; REZENDE, A. Avaliação da toxicidade do fenol e 4-clorofenol para a microalga *Tetraselmis chuii* (*Prasinophyceae*, *Tetraselmidaceae*). In: **VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Vitória-ES. Livro de Resumos, p. 260, 2002.

PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E. Capacity of biosurfactant production og environment *Pseudomonas* and *Vibrionacea* growing on carbohydrates. *Analysis Chemical. Acta*, 1985, 169, 1. PERSON, A.; MOLIN, G. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p. 439-442, 1987.

PENFOLD, J.; THOMASB, R. K.; SHENC, H-H. Adsorption and self-assembly of biosurfactants studied by neutron reflectivity and small angle neutron scattering: glycolipids, lipopeptides and proteins. **Soft Matter**, v. 8, p. 578–591, 2012.

PERALES, J.A. Variabilidad de la biodegradación y toxicidade de compuestos xenobióticos em el médio marino. Aplicación a lineal alquilbenceno sulfonatos em aguas del golfo de Cádiz. Tese de doutoramento. Departamento de Engenharia Química, Tecnologia de Alimentos e Tecnologías do Meio Ambiente. **Universidade de Cádiz**, Espanha, 2001.

PEREIRA, J. F.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R., VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A.; 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.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. K. N. Timmis (ed.), **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 09 p., 1502-1510, 2010.

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

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

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery, **iochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 172–179, 2008.

PRUTHI, V. AND CAMEOTRA, S.S. Effect of Nutrients on Optimal Production of Biosurfactants by *Pseudomonas putida* - A Gujarat Oil Field Isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 899-912, 2004.

RIBÓ, J.M. Evaluación de la contaminación química del medio acuático: el ensayo de bacterias luminescentes. **Tecnología del Agua**, 96, p. 36 – 58, 1992.

RIBOSA, I.; GARCIA, M.T.; SÁNCHEZ LEAL, J.; GONZÁLEZ, J.J. Photobacterium Phosphoreum test data on non-ionic surfactants. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 39 (3-4): 273 – 241, 1993.

RIETZLER, A. C.; PASQUAL, C. B.; LIMA, D.; FONSECA, A. L.; ESPÍNDOLA, E. I. G.; Anais do **5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia**, Itajaí, Brasil, 1998.

ROCHA, M. V. P. Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, **Universidade Federal do Ceará** (UFC), Fortaleza – Ceará, 124 f., 2007.

ROCHA, M. V. P.; BARRETO, R. V. G.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 155(1-3), p. 63-75, 2009.

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*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

ROCHA, M.V.P.; 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*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Online First, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L. R.; BANAT, IBRAHIM M.; MEI, HENNY VAN DER; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p. 470-480, 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. In: Current Opinion in Biotechnology. **Editora Elsevier**, v. 13., p. 249–252, 2002.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

ROSEN, M. J. Surfactants and interfacial phenomena. **Ed. John Wilwy & Sons, USA**, 431 p., 1989.

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

RUFINO, R. D. Produção de biosurfactante por *Candida lipolytica*. *Dissertação de Mestrado* (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife – Pernambuco, 95f., 2006.

RUIZ, F. R. Comportamiento Ambiental de Tensioactivos Comerciales. Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, **Trabajo Final del Máster Universitario en Ciencia e Tecnología de Coloides y Interfases**, Universidad de Granada UGR, 2010.

Safra de caju 2013: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201404.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201404.pdf). 86 páginas. Acessado em 11 de junho de 2013.

SAMSON, R.; CSEH, T.; HAWARI, J.; GREER, C.W.; ZALOUM, R. Biotechnologies applique'es a` la restauration de sites contamine's avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contamine's par des BPC. **Science et Techniques de l'Eau**, v. 23, p. 15–18, 1990.

SÁNCHEZ LEAL, J. A. “Aspectos ecológicos de los detergentes”Gestió i Promoció”. Ed. S.A: Barcelona (1995).

SANDBACKA M.; CHRISTIANSON I.; ISOMAA B. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish—a comparative study. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p.61 - 68, 2000.

SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4585-4588, 2000.

SANTOS, C.F.C. Produção, purificação e caracterização de biosurfactante produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis*. Tese (Doutorado), 214 p., **Campinas**, 2001.

SARMA, S. S.S.; MANGAS-RAMIREZ, E.; NANDINI, S. Effect of ammonia toxicity on the competition among three species of clado cerans (Crustacea: Cladocera). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 227-235, 2003.

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G., CHOPADE, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, Adv. 28, 436–450, 2010.

SCHALLMEY, M., SINGH, A., WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.

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

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, n. 33, p. 163-184, 1995.

SHAHIDZADEH, N.; BONN, D.; MEUNIER, J.; NABAVI, M.; AIRIAU, M.; MORYAN, M. Dynamics of Spontaneous Emulsification for Fabrication of Oil in Water Emulsions. **Langmuir**, 16, p. 9703-9708, 2000.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n.2, p. 119 - 134, 2010.

SHARREL REBELLO; AJU K. ASOK; SATHISH MUNDAYOOR; M. S. JISHA. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. **Environmental chemistry letters** [1610-3653], 12 (2), p. 275 -287, 2014.

SHAW, D.J. Introdução à química dos colóides e de superfícies. São Paulo: **Editora Edgard Blücher Ltda**, 1970.

SHAW, D.J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry, **Butterworth-Heinemann**, Oxford, (4ª Ed.), 1992.

SHEPP, D. L.; CUMMINS, J. D. Restoration in an urban watershed: Anacostia River of Maryland and the district of Columbia. In: WILLIAMS, J. E.; WOOD, C.A.; DOMBECK, M. P. (Ed.). Watershed restoration: principles and practices. Bethesda: American Fisheries Society, p. 297-317, 1997.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.

SILVA, C. R. R.; KIPERSTOK, A. Água produzida na extração de petróleo. Monografia, Escola politécnica - Departamento de hidráulica e saneamento, 2000.

SILVA, R.C.R.F. Resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria do petróleo. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais, **Universidade Católica de Pernambuco**, 149 p., 2012.

SILVEIRA, E. L. C.; DE CALAND, L. B.; DE MOURA, C. V. R.; MOURA, E. M. Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes. **Química Nova**, v. 29(6), p. 1193-1197, 2006.

SINGH, A., VAN HAMME, J. D. AND WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-122, 2007.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; RAY, A.; GUPTA, A.; SEN, R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. **Bioresource Technology**, 101, 2884–2887, 2010.

SKORNYAKOV, I. V.; TOLSTOROZHEV, G. B.; BUTRA, V. A. "Infrared Absorption Spectra of Human Malignant Tumor Tissues." **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 75, p. 420-425, 2008.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a General Overview. In **Biosurfactants**, Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, p. 1-11, 2011.

SOOKKHEO, B., SINCHAIKUL, S., PHUTRAKUL, S., CHEN, S.T. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. **Protein Expression and Purification**, v. 20, p. 142–151, 2000.

SOUSA, J.R. ; CORREA, J.A.C. ; MELO, V.M.M. ; GONÇALVES, L.R.B. ; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova** (Impresso), v. 37, p. 431-441, 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 main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p.897-906, 2012.

SOUZA FILHO, M.S.M.; Aspectos da Avaliação Física, Química, Físico-Química e Aproveitamento Industrial de Diferentes Clones de Caju (*Anacardium occidentale*, L). (Tese de Mestrado), Universidade Federal do Ceará, 196 pg., 1987.

STEBER, J.; GUHL, W.; STELTER, N.; SCHRÖDER, F. R. Alkyl polyglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. **Tenside, surfactants, detergents**, v. 32(6), p. 515-521, 1995.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions, **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845 - 857, 2005.

STELLER, S.; VATER, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 737(1), 267-275, 2000.

STUART, BARBARA. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, **John Wiley & Sons**, Ltd., 2004.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT IBRAHIM M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2010.08.099, (2010).

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **Fems Microbiology Letters**, v. 128, p. 101 - 106, 1995.

UNE 55-844-91 (NORMA UNE 55-844-91). Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.

UNE EN ISO 11348-2 (NORMA UNE EN ISO 11348-2:2007). Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes).

UNE-EN ISO 10712:1996 (ISO 10712:1995). Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de las *Pseudomonas putida* (Ensayo de inhibición de la multiplicación celular en *Pseudomonas*).

UNE-EN ISO 6341:1996 (NORMA UNE EN ISO 6341:1996). Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* straus (*Cladocera crustácea*). Ensayo de Toxicidad aguda.

UNE-EN ISO 8692:2012 (NORMA UNE EN 8692:2012). Calidad del agua: Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con algas verdes unicelulares. (ISO 8692:2012).

VALRAEDS-MARTINE, M.C.; VANDERMEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J.: Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 8, n.1, p. 51 - 61, 1996.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

VAN GINKEL, C.G. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. **Biodegradation**, v. 7, p. 151-164, 1996.

VAN OSS, C; GOOD, R.; CHAUDHURY, M. Additive and non additive surface tension components and its interpretation of contact angles, **Langmuir**, v. 4(4), p. 884-891, 1988.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 175-180, 2011.

VILLARROEL, M. J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 53(8), p. 857-864, 2003.

VILLEGAS-NAVARRO, A.; GONZALEZ, M. C. R.; LOPEZ, E. R. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. **Environ. Internai**, v. 25, n. 5, p. 619-624, 1999.

VINCENT, J. M. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. **IBP Handbook**, n. 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

VOLLENBROICH, D; OZEL, M; VATER, J; KAMP, R. M; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, n. 25, p. 289-297, 1997.

VREYSEN, S.; MAES, A. Remediation of a Diesel Contaminated, Sandy-Loam Soil Using Low Concentrated Surfactant Solutions (5 pp). **Journal of Soils and Sediments**, v. 5(4), p. 240-244, 2005.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 59, n.1, p. 37-43, 1997.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 59, n.1, p. 37-43, 1997.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 724-728, 1998.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 479-482, 2002.

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.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 979-983, 2004.

WEI, Y.H.; LAI, C.C.; CHANG, J.S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, ed. 1, p. 40-45, 2007.

WHANG, L.M.; LIU, P.W.G.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil.

Journal of Hazardous Materials, v. 151, p. 155–163, 2008.

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

YING. G. G. Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradacion products in the environment. **Environmental International**, v. 32, p. 417-431, 2006.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGER, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms **Journal Microbiology Methods**, v. 56, p. 339–346, 2004.

YUAN, Y.; LEE, T.R. Contact angle and wetting properties. In: Bracco B Holst, (eds.), Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, n. 51, p. 3-34, 2013.

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews Biotechnology**, v. 1, ed. 2, p. 87-107, 1984.

ZEIRAK, A.E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbioly**, n. 61, p. 554-559, 2010.

ZENG, X.T.; XU, Y.Z.; ZHANG, X.Q.; XU, Z.; ZHANG, Y.F.; WU, J.G.; ZHOU, X.S.; LING, X.F. "FTIR spectroscopic explorations of freshly resected thyroid malignant tissues", **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 27

ANEXOS

ANEXO A

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DO PRESENTE ESTUDO

doi> Freitas de Oliveira, Darlane Wellen; França, Ítalo Waldimiro Lima; Félix, Anne Kamilly Nogueira; Martins, João Jeferson Lima; Giro, Maria Estela Aparecida; Melo, Vânia Maria M.; Gonçalves, Luciana Rocha Barros. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces (Print)., v.98, p.COLSUB5184 - , 2013. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776512003426>]

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I.W.L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice In: 8th European Symposium on Biochemical Engineering - ESBES, 2010, Bologna. **8th European Symposium on Biochemical Engineering - ESBES.** , 2010.

APOLONIO, J. A. M.; **OLIVEIRA, D. W. F.**; FRANÇA, I. W. L.; FELIX, A.K.N.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Influence of agitation on the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* grown in clarified cashew apple juice. In: 8th European Congress of Chemical Engineering/1st European Congress of Applied Biotechnology, 2011, Berlim (Alemanha). **8th European Congress of Chemical Engineering/1st European Congress of Applied Biotechnology**, 2011.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; BEZERRA, D.P. ; APOLONIO, J. A. M.; Felix, A.K.N ; MELO, V. M. M. ; GONÇALVES, L. R. B. Influence of pH on the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. In: **11th International Chemical and Biological Engineering Conference CHEMPOR, Lisboa – Portugal**, 2011.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I.W.L.; FELIX, A. K. N.; APOLONIO; J. A. M., BEZERRA; D. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005: avaliação do meio de cultivo In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011, Caxias do Sul. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2011.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I.W.L.; BEZERRA, D. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção de biosurfactantes por linhagens de *Bacillus sp.* In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, 2012, Búzios - RJ. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, 2012.** Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

BEZERRA, D.P.; **OLIVEIRA, D.W.F.**; FRANÇA, I. W. L; APOLONIO, J. A. M. ; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Avaliação da influência da temperatura na produção de surfactina por *Bacillus subtilis*. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2013, Foz do Iguaçu. **XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, 2013.

OLIVEIRA, D. W. F.; BEZERRA, D.P.; FRANÇA, I. W. L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L.R.B. Evaluation of the potential of biosurfactant production by *Bacillus strains* in different culture media. In: 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2013, Portland, OR. **35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 2013.

OLIVEIRA, D. W. F.; BEZERRA, D.P.; FRANÇA, I. W. L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L.R.B. Biosurfactantes production by bacterial strains isolated from mangroves of Ceará - Brazil. In: 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2013, Portland, OR. **35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 2013.

FREITAS DE OLIVEIRA, DARLANE W.; MOYA RAMIREZ, IGNACIO; MACIEL MELO, VÂNIA M.; JURADO ALAMEDA, ENCARNACIÓN; ROCHA BARROS GONÇALVES, LUCIANA; ALTMAJER VAZ, DEISI. Production of a biosurfactant from *Bacillus sp.* and its application to the remediation of a motor-oil-contaminated sand. **20th International Symposium on Surfactants in Solution (SIS 2014)**, Portugal.

DARLANE WELLEN FREITAS DE OLIVEIRA; ALEJANDRO BURGOS CARA; MANUELA LECHUGA VILLENA; VÂNIA MARIA MACIEL MELO; LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES; DEISI ALTMAJER VAZ. Biodegradability of a biosurfactant produced by a microorganism isolated from the soil of a mangrove (Ceará, Brazil). **16th International Biotechnology Symposium and Exhibition -(IBS 2014)**, Fortaleza - Ceará.

DARLANE WELLEN FREITAS DE OLIVEIRA; IGNÁCIO MOYA RAMÍREZ; DANIELLE MAASS; MIGUEL GARCÍA-ROMÁN; DEISI ALTMAJER VAZ; LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from oil wastes and “alpeorujo”. **16th International Biotechnology Symposium and Exhibition -(IBS 2014)**, Fortaleza - Ceará.



Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice

Darlane Wellen Freitas de Oliveira^a, Ítalo Waldimiro Lima França^a,
Anne Kamilly Nogueira Félix^a, João Jeferson Lima Martins^a, Maria Estela Aparecida Giro^a,
Vânia Maria M. Melo^b, Luciana Rocha Barros Gonçalves^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Bloco 709, Campus do Pici, CEP. 60.455-760, Fortaleza, CE, Brazil

^b Universidade Federal do Ceará, Depto. de Biologia, LemBiotech, Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Bloco 909, Campus do Pici, CEP. 60.455-760, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2011
Received in revised form 2 May 2012
Accepted 12 June 2012
Available online xxx

Keywords:

Biosurfactant
Biotransformations
Clarified cashew apple juice
Fructose, Glucose
Submerged culture

ABSTRACT

In this work a low cost medium for the production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* LAMI005 and the kinetics of surfactin production considering the effect of initial substrate concentration were investigated. First, cashew apple juice supplementation for optimal production of biosurfactant by *B. subtilis* LAMI005 was studied. The medium formulated with clarified cashew apple juice and distilled water, supplemented with 1.0 g/L of (NH₄)₂SO₄, proved to be the best among the nutrients evaluated. The crude biosurfactant had the ability to decrease the surface tension of water to 30 dyne/cm, with a critical micelle concentration (CMC) of 63.0 mg/L. Emulsification experiments indicated that this biosurfactant effectively emulsified kerosene (IE₂₄ = 67%) and soybean oil (IE₂₄ = 64%). Furthermore, the emulsion stability was always very high. It was shown by biochemical analysis, IR spectra, that there is no qualitative differences in the composition of the crude biosurfactant from a standard sample of surfactin from *B. subtilis*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Surfactants are surface active substances, consisting of a hydrophilic (polar) and a hydrophobic (nonpolar) part on its molecules [1,2]. They have the ability to reduce surface and interface tensions between liquids, solids, and gases, thus they allow them to mix or disperse readily as emulsions in water or other liquids [2]. Nowadays, the huge demand of surfactants is currently provided by chemical surfactants derived from petroleum, but these compounds have the problem of being toxic to the environment and non-biodegradable.

A biosurfactant is a surfactant produced extracellularly or as part of the cell membrane by bacteria, yeasts, and fungi from various substrates including sugars, oils, alkanes, among others [1]. They are amphiphilic compounds with considerable potential in commercial applications within various industries, such as health care and food processing industries, as well as enhancing oil recovery, crude oil drilling lubricants, bioremediation of water-insoluble pollutants [1,3,4]. Biosurfactant have advantages over its chemical counterparts in biodegradability and effectiveness at extreme

conditions of temperature and pH. Furthermore, they have lower toxicity and can be produced from renewable and cheaper substrates [2,5–7]. However, the production of biosurfactant has some issues associated with the expensive costs of substrates and some inefficient product recovery methods [7]. Therefore, in order to enhance the industrial use of biosurfactant, the production cost should become competitive with the synthetic surfactants. A possible strategy to achieve this goal is to use alternative raw materials, such as agro-industrial residues such as cashew apple peduncle, as culture medium in submerged fermentation.

In the north coast of Brazil, the cashew agroindustry has an important role on local economy and the official estimate for the Brazilian cashew nut for 2011 was around 298 thousand of tons [8], which corresponds to more than 2.6 million tons of cashew apple. However, only 18% of the total peduncle is consumed *in natura* or processed industrially to produce different products from concentrated juice to desserts. It is estimated that about 15–20% of the pulp is exploited and 80% is wasted. Cashew apple is a pseudofruit rich in vitamin C, flavor and aroma, but the majority of cashew apples rot in the soil. Those facts, together with its rich composition (reducing sugar, vitamins and minerals salts), turns cashew apple juice (CAJ) into an interesting and inexpensive culture medium for biosurfactant production [9].

Bacillus subtilis is considered a suitable microorganism for biosurfactant production owing to the absence of pathogenicity, which permits the use of its products in food and pharmaceutical

* Corresponding author at: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 709, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil.
Tel.: +55 85 3366 9611; fax: +55 85 3366 9610.

E-mail address: lrg@ufc.br (L.R.B. Gonçalves).

Table 1

Description of culture medium employed in this study using *Bacillus subtilis* LAMI005 in batch cultivation. TRS: total reducing sugars, mainly glucose and fructose, present in clarified cashew apple juice and TES: trace element solution, consisting in g/L by ZnSO₄·7H₂O: 10.95, FeSO₄·7H₂O: 5.0, MnSO₄·H₂O: 0.39, CuSO₄·5H₂O: 54, Co(NO₃)₂·6H₂O: 0.25 and Na₂B₄O₇·10H₂O: 0.17.

Culture medium	Nature of ingredients			
	C-source (g/L)	N-source (g/L)	TES (%)	Other (g/L)
A	TRS (46.24)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1.0)	–	–
B	TRS (40.98)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1.0)	0.1	–
C	TRS (45.66)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1.0)	–	NaCl (2.7)
D	TRS (49.96)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1.0)	–	MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.6)
E	TRS (43.79)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1.0)	–	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (7.2) KH ₂ PO ₄ (3.0)

industries [10]. Therefore, discovery of new strains and improvement on culturing methods of *B. subtilis* can provide a safe source of biosurfactant. Surfactin, one of the most effective cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *B. subtilis*, can lower the surface tension of water from 72 to 27 dyne/cm and the interfacial tension of the water/n-hexadecane system from 43 dyne/cm to 1 dyne/cm [7].

Therefore, the aim of this work was to evaluate a low cost culture medium, using cashew apple as carbon and energy source, to cultivate a new isolate of *B. subtilis* and to produce biosurfactant. The influence of juice concentration and its effect on biosurfactant concentration and surface activity were also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

B. subtilis LAMI005 used in this study was previously identified as a potential producer of biosurfactant [11] and it was isolated from the tank of chlorination at the Wastewater Treatment Plant on Campus do Pici (WWTP-PICI) in the Federal University of Ceará, Brazil. It was identified by 16S rRNA gene sequence, which was deposited at Genbank with the accession number FJ413046. The strain was maintained on APGE medium (consisting of 15.0 g/L Agar, 5.0 g/L peptone, 5.0 g/L glucose, and 2.5 g/L yeast extract) slants at 4 °C and transferred monthly as described in a previous work [11].

2.2. Clarified cashew apple juice preparation

Cashew apple juice (CAJ) was obtained by compressing the cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). The juice was then centrifuged at 5000 × g for 20 min (BIO ENG, BE-6000), filtered using a 45 μm filter paper and clarified using gelatin (10–30%, w/v). The clarified cashew apple juice (CCAJ) was kept at –10 °C and it contains basically glucose, fructose, minerals and free amino acids as described before [9].

2.3. Culture medium

Clarified cashew apple juice (CCAJ) was diluted with water, supplemented with different nutrients (Table 1) and used in this study as culture medium for *B. subtilis* LAMI005 growth and biosurfactant production. The pH of the medium was adjusted to 7.0 with HCl (3 M) or NaOH (3 M) and it was sterilized at 110 °C for 10 min. When necessary, 0.1% (v/v) of a sterile trace element solution (consisting in g/L by ZnSO₄·7H₂O: 10.95, FeSO₄·7H₂O: 5.0, MnSO₄·H₂O: 0.39, CuSO₄·5H₂O: 54, Co(NO₃)₂·6H₂O: 0.25 and Na₂B₄O₇·10H₂O: 0.17) was added after autoclavation.

2.4. Inoculum preparation

B. subtilis LAMI005 was inoculated (spread) onto APGE plates and incubated at 30 °C for 24 h. After this period, three loops full of the strain grown on APGE were transferred to 250-mL Erlenmeyer

flask containing 50 mL of CCAJ, diluted with water up to 22.92 g/L of total reducing sugars (glucose and fructose), supplemented with 1.0 g/L of (NH₄)₂SO₄ and 0.1% of trace element solution (consisting in g/L by ZnSO₄·7H₂O: 10.95, FeSO₄·7H₂O: 5.0, MnSO₄·H₂O: 0.39, CuSO₄·5H₂O: 54, Co(NO₃)₂·6H₂O: 0.25 and Na₂B₄O₇·10H₂O: 0.17). The flasks were incubated in a rotary shaker (Tecnal-TE240, São Paulo, Brazil) at 180 rpm, 30 °C for 24 h. The OD of this culture was adjusted with sterile water to 0.1–0.2 at 600 nm, in order to assure that the same cell concentration was present at the seed culture.

2.5. Batch fermentation for biosurfactant production

Biosurfactant production was conducted in Erlenmeyer flask (250 mL) containing 50 mL aliquots of the culture medium. An aliquot of 5 mL (10%, v/v) of the seed culture was transferred to the Erlenmeyer flask and the experiments were carried out in a rotary shaker (Tecnal-TE240) at 180 rpm, 30 °C for 72 h. Samples were collected at defined intervals of time and submitted to analysis of biomass. Cells were removed by centrifugation at 10,000 × g for 20 min and the cell-free supernatant was assayed to determine its pH, carbohydrates, and surfactin concentrations. All assays were performed in duplicate and the results represent means ± standard deviations of the two independent experiments.

2.6. Analytical methods

2.6.1. Biomass content

Cell growth was determined by measuring the optical densities (OD) of samples, using a UV–vis spectrophotometer (20 Genesis, BR) at 600 nm. Biomass concentration, in g/L, was determined by calibration curve of dry weight (g/L) versus OD [11].

2.6.2. Carbohydrate concentration

Substrate concentration (glucose and fructose – Total Reducing Sugars, TRS) was measured by HPLC using a Waters high-performance-liquid chromatographer (Waters, Milford, MA) equipped with a refractive index detector (Model 2414, Waters), a Supelcogel C610H (30 cm × 7.8 mm) column and a Sigma–Aldrich pre-column (5 cm × 4.6 mm). Ultrapure water (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) with 0.1% v/v of H₃PO₄ was used as solvent with a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature (around 28 °C) and the sample size was 10 μL. The samples were identified by comparing the retention times with those of carbohydrate standards.

2.6.3. Emulsification index

Emulsifying index was performed according to Cooper and Goldenberg [12], with slight modifications [13]: 2 mL of cell-free supernatant were added to 2 mL of kerosene, gasoline or soybean oil, and the mixture was vortexed for 2 min. After 24 h, the height of

emulsion layer was measured. The emulsification index (IE_{24}) was calculated using Eq. (1).

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_s} \times 100 \quad (1)$$

where H_{EL} is the height of the emulsion layer and H_s is the height of total solution. A control sample was prepared by using 2 mL of culture medium before inoculation instead of the cell-free supernatant.

2.6.4. Emulsification activity

Emulsification activity was determined according to Cirigliano and Carman [14], with slight modifications [11]. Samples of the supernatant free of cells (0.5 mL) were placed in a screw-capped test tube (15 × 125 mm) and diluted with 0.5 mL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.6); 0.25 mL of kerosene was added, the tube was capped, and the mixture was shaken for 2 min at room temperature (around 28 °C). The resulting uniform emulsion was allowed to sit for 10, 20, 30, 40 and 50 min, after which its absorbance (A) was measured at 540 nm with a UV-vis spectrophotometer (20 Genesis, BR). One unit (U) of emulsification activity was defined as that amount of emulsifier that affected an emulsion with A of 1.0 at 540 nm.

2.6.5. Surface tension determination

Surface tension was determined by a Tensiometer (Kruss K6) at 30 °C, according to the De Nöuy ring method [15]. The surface tension determination was replicated at least three times and it was performed using cell-free supernatants.

2.6.6. Surfactin extraction

Surfactin extraction was performed according to the literature [11], with slight modifications: cells were separated by centrifugation at 10,000 × g for 20 min at 15 °C. The pH of 20 mL of cell-free supernatant was adjusted to 2.0 by adding 3 M HCl. The resultant solution was maintained at rest for 12 h to allow surfactin to settle. The precipitate was collected by centrifugation at 10,000 × g for 15 min at 15 °C, and the crude surfactin was obtained. For further purification, the crude surfactin was dissolved in 8.0 mL of deionized water and it was extracted three times by using an equal volume of dichloromethane (Vetec, São Paulo, Brazil). The solvent layer was harvested and evaporated at room temperature (around 28 °C). The resulting brown-colored paste was dissolved in 2.0 mL methanol, achieving a solution containing a semi-purified surfactin.

2.6.7. Determination of surfactin concentration

Surfactin concentration was measured by HPLC using a Waters high-performance-liquid chromatographer equipped with a UV detector (Model 2487, Waters), at 205 nm, and a Symmetry C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm, Waters, Ireland). The mobile phase consisted of 20% v/v TFA (3.8 mM) and 80% v/v acetonitrile. The elution rate was 1 mL/min at 30 °C and the sample size was 20 μL. The identity of the semi-purified surfactin was obtained by using commercially available 95% pure surfactin (Sigma-Aldrich) as the authentic compound [16].

2.6.8. Determination of critical micelle concentration (CMC)

Different concentrations of the produced surfactin were obtained by performing several dilutions of cell-free fermented medium, after 48 h of fermentation [17]. Surface tension of the resulting solutions was measured at room temperature, as described above. The CMC was determined by plotting the surface tensions as a function of surfactin concentration and it was found from the intercept of two straight lines extrapolated from the concentration-dependent and concentration-independent sections [18].

2.6.9. Vibrational spectroscopy in the infrared region – FT-IR

The dried biomaterial was milled with KBr to form a very fine powder. This powder was then compressed into a thin pellet which could be analyzed by FT-IR spectra measurement, carried out by using a spectrometer model FTLA 2000-ABB, with a spectral window from 400 to 4000 cm^{-1} .

2.7. Calculation of fermentation parameters

Substrate conversion was calculated according to Fogler [19], see Eq. (2):

$$\Delta S(\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (2)$$

where S_0 is the initial substrate concentration (glucose plus fructose) and S the substrate concentration (glucose plus fructose) in the samples at each time interval.

The volumetric productivity (P_P and P_X) was calculated as the ratio of maximum biosurfactant (P_{max} , mg/L) or cell concentration (X_{max} , g/L) to the fermentation time when the maximum concentration was achieved ($t_{P_{max}}$ or $t_{X_{max}}$, respectively, h):

$$P_P = \frac{P_{max}}{t_{P_{max}}} \quad (3)$$

$$P_X = \frac{X_{max}}{t_{X_{max}}} \quad (4)$$

The yield of biosurfactant on cell mass ($Y_{P/X}$, g/g) was defined as:

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_0}{X_f - X_0} \quad (5)$$

where P_0 and X_0 are the initial product and cell concentration, while P_f and X_f product and cell concentration in the samples at each time interval.

3. Results and discussions

3.1. Evaluation of cashew apple juice supplementation for optimal production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LAMI005 in batch cultivation

In a previous work, the viability of biosurfactant production by *B. subtilis* LAMI005 grown on a mineral medium formulated using clarified cashew apple juice and several nutrients was demonstrated [11]. Since the type of medium and growth conditions can influence the type and yield of the biosurfactant [20], in this work, the influence of juice supplementation on biosurfactant production was investigated, aiming at reducing costs of production. Fig. 1 shows the profile of substrate conversion, cell concentration, surfactin production by *B. subtilis* LAMI005 and surface tension of the fermented broth free of cells after 30 h of fermentation using five different culture media, see Table 1.

It can be observed in Fig. 1A and B that the strain was able to grow and produce biosurfactant in all culture medium evaluated. The amount of surfactin varied from almost 35 mg/L to more than 175 mg/L, depending on the medium used. Furthermore, surface tensions (Fig. 1B) of the cell-free fermented broths were reduced from 53–54 dyne/cm to 29–30 dyne/cm, except for media D and E (around 36 dyne/cm). According to the literature [1,15,21], the effectiveness of a surfactant is determined by its ability in reducing surface tension of water below 35 dyne/cm. Therefore, the reduction of surface tension to those levels indicates the production of surface active compounds by *B. subtilis* LAMI005. Fig. 1B also indicates a correlation between surfactin concentration and surface tension of the fermented broth free of cells, since an expressive decrease (below 30 dyne/cm) in surface tension is observed only

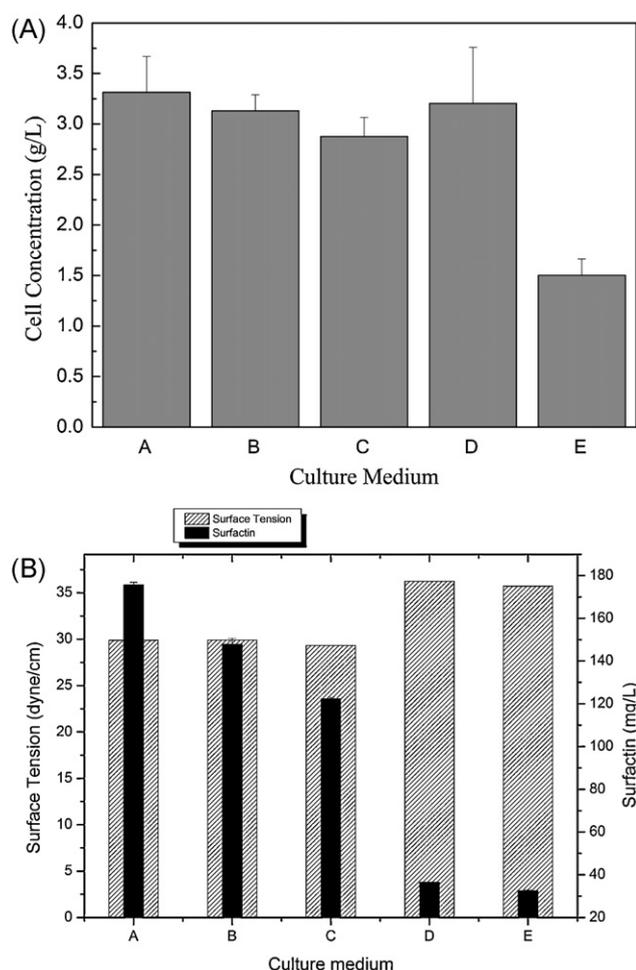


Fig. 1. Influence of supplementation of clarified cashew apple juice on biosurfactant production by *B. subtilis* LAMI005 cultivated at 30 °C, 180 rpm for 30 h: (A) Cell concentration and (B) surfactin concentration and surface tension of the fermented broth free of cells. Medium A: clarified cashew apple juice and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, medium B: clarified cashew apple juice, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and trace element solution, medium C: clarified cashew apple juice, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NaCl, medium D: clarified cashew apple juice, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Medium E: clarified cashew apple juice, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and KH_2PO_4 . The surface tension of the un-inoculated broths incubated in the same conditions was 51–54 dyne/cm. Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from two independent experiments.

for media A–C, when more than 120 mg/L of biosurfactant concentration was achieved. It is worthy of note that regardless of the surfactant concentration, a further decrease in the surface tension will not be observed once the critical micelle concentration (CMC) has been reached [22]. Therefore, even though surfactin concentration in medium A is higher than in media B and C, the surface tension value in these samples is almost the same probably because the CMC has been achieved.

Since the highest surfactin production (higher than 140 mg/L) with the best tensoactive characteristics (decrease in surface tension to less than 30 dyne/cm) was achieved when media A and B were used, they were selected for further studies.

3.2. Effect of incubation time on growth and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005

The influence of incubation time on biosurfactant production and surface activities of culture supernatants was investigated. The profiles of substrate consumption, surfactin production and cell

growth are pictured in Fig. 2A and B, respectively, when *B. subtilis* LAMI005 was cultivated in media A and B.

A plot of $\ln(\text{cell concentration})$ versus time (data not shown) allowed to observe an intense cell growth up to 48 h or 24 h of fermentation, for media A and B, respectively, when stationary phase was achieved. An experimental biosurfactant production ($Y_{P/X}$) of 0.052 g surfactin/g cells (24 h) and 0.052 g surfactin/g cells (8 h) were obtained, respectively, for media A and B. The highest surfactin concentration (219.99 ± 0.4 mg/L), however, was achieved when *B. subtilis* LAMI005 was cultivated in medium B (Fig. 2B). Other authors [11], who studied the production of surfactin by the same microorganism using mineral media and clarified cashew apple juice (MM-CAJC), achieved a surfactin concentration around 125 mg/L, which is lower than the result obtained in this work.

The volumetric production rate (P_p , g/(L h)) of surfactin, however, was higher for medium A ($P_p = 7.3$ mg/(L h)) when compared to results in medium B ($P_p = 4.2$ mg/(L h)). When *B. subtilis* LAMI005 was cultivated in medium A (Fig. 2A), maximum production of biosurfactant (around 177.93 ± 0.1 mg/L) was observed between 24 h and 48 h. However, the pH of the fermented broth reached values below 5.0 after 48 h (data not shown), which may have caused surfactin precipitation, underestimating surfactin concentration in the supernatant. Several authors [4,23–25] observed that surfactin precipitates at acidic pH values (≤ 5). Wei et al. [26], working with *B. subtilis* ATCC 21332 in iron-enriched culture, observed that the acidification of the broth caused surfactin precipitation resulting in the disappearance of soluble surfactin at pH lower than 5.0, whereas the insoluble surfactin was dissolved completely when the pH was increased back to pH 6.0 by adding NaOH.

Although high concentrations of glucose and fructose were still present in the culture medium (Fig. 2), an interruption of cellular growth and biosurfactant formation occurred. At the end of the process (72 h), total sugar (glucose and fructose) conversion was, respectively, 30.2% and 32.0% for media A and B. One possible explanation is a limitation on the nitrogen source needed for bacterial metabolism. Usually the carbon to nitrogen ratio is important to the product yield of bioactive molecules, which may have limited the process. Moreover, the end of the fermentation process may be associated with the formation of toxic by-products accumulation in the medium [27].

Based on the results of surfactin concentration, and considering that the cost of production of medium B is higher than the cost of medium A, which may be an obstacle on the way of industrial application, medium A was selected for further studies.

3.3. Kinetics of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 considering the effect of carbon source concentration

To investigate the kinetic behavior of *B. subtilis* LAMI005 growth and biosurfactant production in batch cultivation, CCAJ was diluted with water, to achieve different initial concentrations of total reducing sugars (glucose and fructose), and supplemented with ammonium sulfate (1.0 g/L). Sugar concentration varied from 13 g/L to 96 g/L (undiluted juice). Fig. 3 shows the experimental results of cell growth, surfactin production, substrate consumption and pH of the fermented broth along time.

Fig. 4A shows a sigmoidal growth trend for the *B. subtilis* LAMI005 cells, in which the exponential growth phase and the stationary phase can be observed. A plot of $\ln(\text{cell concentration})$ versus time (data not shown) allowed observing that, when more than 48.96 g/L of initial sugar concentration was used, the cells entered an exponential growth phase before 10 h and continued up to 48 h. Moreover, a stationary phase was reached, which started at 48 h and lasted until 72 h. When more than 12.71 g/L of initial sugar concentration was used, the stationary phase was reached at 48 h. Maximum cell concentration and volumetric biomass

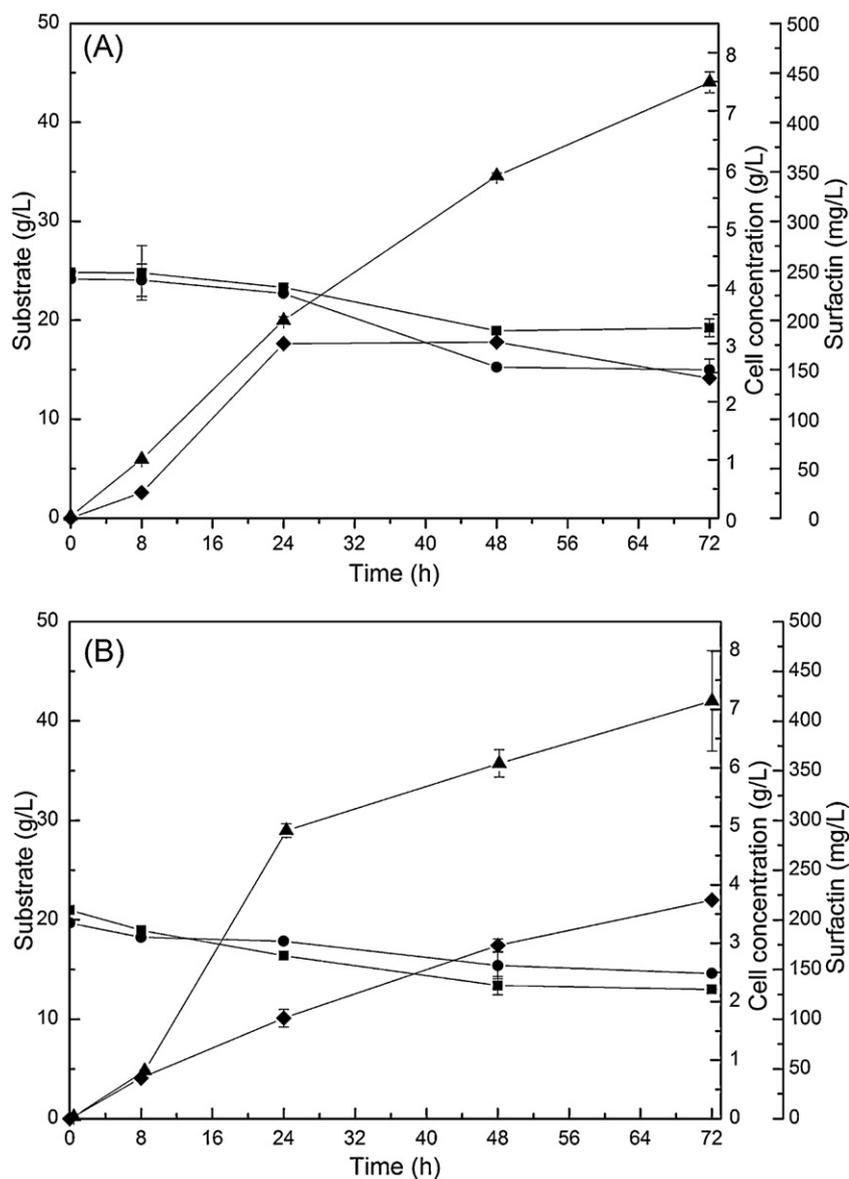


Fig. 2. Influence of incubation time on biosurfactant production by strains of *B. subtilis* LAMI005 cultivated at 30 °C, 180 rpm for 72 h: cell concentration (\blacktriangle), glucose (\bullet) and fructose (\blacksquare) consumption and surfactin production (\blacklozenge). Medium A: clarified cashew apple juice and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, medium B: clarified cashew apple juice, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and trace element solution. Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from two independent experiments.

productivity increased with increasing sugar concentrations up to 65.04 g/L, when it remained almost constant, see Table 2.

Similar to cell concentration, maximum product (surfactin) concentration was also affected by the increase in sugar concentration in the culture medium, Fig. 3B and Table 2. Product concentration increased with increasing sugar concentration up to 65.04 g/L. When sugar concentration was enhanced to 96.1 g/L,

biosurfactant production was lower. The highest concentration of surfactin (319.3 ± 0.1 mg/L) was achieved after 72 h of incubation of *B. subtilis* LAMI005 on CCAJ, at an initial sugar concentration of 65.04 g/L, supplemented with ammonium sulfate (1.0 g/L). Other authors [28], who studied the production of surfactin by *B. subtilis* ATCC 21332 using glucose as carbon source, achieved maximum surfactin concentrations in various nutritional conditions ranging

Table 2

Main kinetic results of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 at different initial substrate concentration (S_0). ΔS is substrate conversion, $Y_{p/x}$ is the yield of biosurfactant on cell mass, P_{\max} is the maximum biosurfactant concentration, X_{\max} is the maximum biomass concentration, P_x is the volumetric biomass productivity and P_p is the volumetric biosurfactant productivity. Experiments were performed in duplicate and the results represent means \pm standard deviations of the two independent experiments.

Run	S_0 (g/L)	pH ^a	ΔS (%) ^a	$Y_{p/x}$ (g/g) ^b	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (mg/L)	P_x (g/Lh)	P_p (mg/Lh)
1	12.71 ± 0.05	3.9 ± 0.56	38.6 ± 0.06	0.0148	2.0 ± 0.16	30.7	0.09	1.3
2	48.96 ± 0.09	4.0 ± 0.16	30.2 ± 4.16	0.0523	7.5 ± 0.18	177.9	0.14	3.7
3	65.04 ± 0.29	5.0 ± 0.62	34.3 ± 0.33	0.0450	8.6 ± 0.94	319.3	0.20	4.4
4	96.10 ± 1.42	6.8 ± 0.01	28.7 ± 1.34	0.0354	8.4 ± 0.12	214.2	0.17	4.0

^a After 72 h of incubation.

^b Calculated for the growth phase.

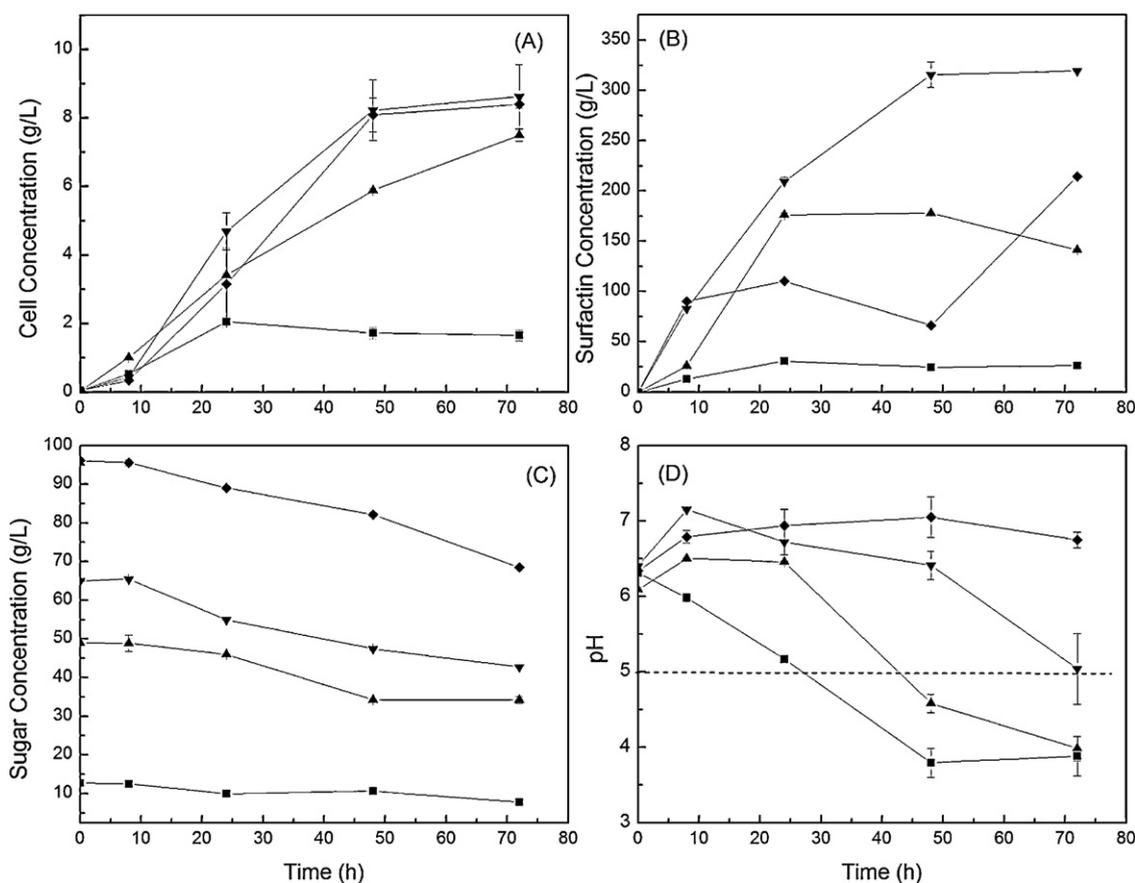


Fig. 3. Time course profiles of *Bacillus subtilis* LAMI005 cell growth (A), surfactin production (B), substrate consumption (C) and pH of the fermented broth (D) at 30 °C, 180 rpm for 72 h. Culture medium was composed of clarified cashew apple juice (CAJ) + ammonium sulfate (1.0 g/L) with different initial substrate concentrations: (■) 12.71 g/L, (▲) 48.96 g/L, (▼) 65.04 g/L, (◆) 96.10 g/L (undiluted juice). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from two independent experiments.

from 31.2 to 439.0 mg/L. Volumetric biosurfactant productivity (P_p) was also affected by the initial substrate concentration in the culture medium. P_p increased with increasing sugar concentrations up to 65.04 g/L, when it remained almost constant, see Table 2.

The production of biosurfactant can alternatively be evaluated through the yield of biosurfactant on cell mass ($Y_{P/X}$), a volume-independent parameter very useful in scale up [10]. It can be observed in Table 2 that there is an optimal initial substrate

concentration to this parameter, $S_0 = 48.96$. A decrease or increase in S_0 was expressed in a lower $Y_{P/X}$. Other authors [28], working with *B. subtilis* ATCC 21332, obtained a $Y_{P/X}$ ranging from 0.0068 to 0.075 g/g, depending on the nutritional condition evaluated.

According to some authors [3,16,29,30], glucose and fructose, which are present in cashew apple juice, are suitable substrates for the synthesis of biosurfactant. However, low substrate conversion (less than 40%), see Table 2, was achieved in all assays, which indicated that carbon limitation did not occur. Since an increase in cell concentration, together with higher product formation, is observed when sugar concentration is increased, it is possible that another nutrient present in the juice, for instance, amino-acids, favors biosurfactant production. Other authors [28], who used 30 g/L glucose as carbon source and 1.0 g/L of ammonium nitrate as nitrogen source under aerobic and nitrogen limited condition with *B. subtilis* ATCC 21332, also observed large amounts of residual glucose at the end of the assay. It is also important to notice that expressive substrate consumption, see Fig. 3C, started between 8 and 24 h of incubation, which may indicate a lag phase have occurred before this period.

After 72 h of cultivation, the acidification of culture medium was observed; except for run 4 ($S_0 = 96.1$ g/L), see Table 2 and Fig. 3D. It can also be observed that media prepared with small amounts of juice became more acidic. This may be explained by the buffer effect provided by protein constituents present in cashew apple juice [9]. Another hypothesis for the fast pH decrease is the change from aerobic to anaerobic respiration. *B. subtilis* grows in the absence of oxygen using nitrate ammonification and various fermentation processes. Lactate, acetate, acetoin, ethanol, and succinate are the

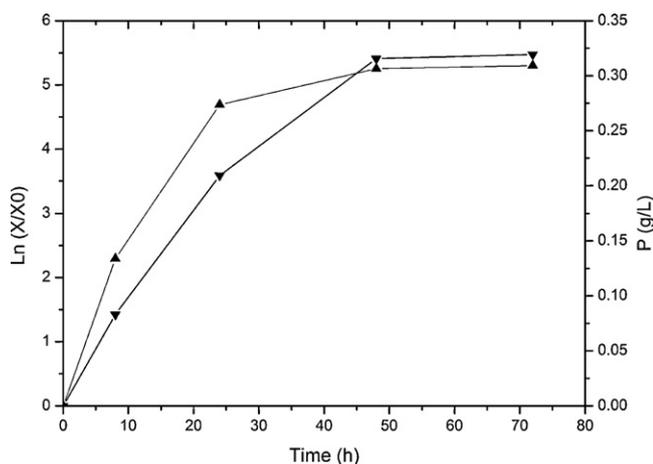


Fig. 4. Time behavior of the $\ln(X/X_0)$ (▲) and biosurfactant concentration (P) (▼) during the cultivation of *B. subtilis* LAMI005 on clarified cashew apple juice ($S_0 = 65.04$ g/L) supplemented with ammonium sulfate (1.0 g/L) at 30 °C and 180 rpm.

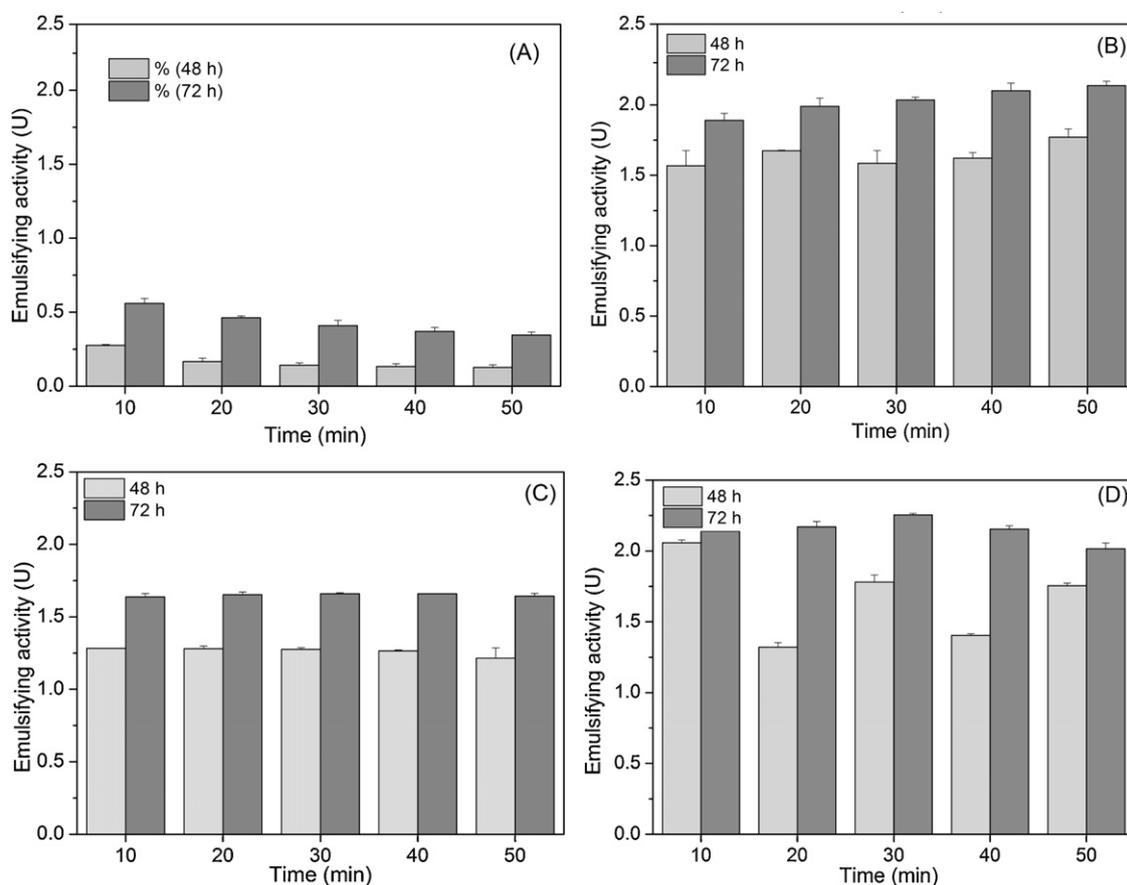


Fig. 5. Emulsifying activity (U) of surfactin produced by *B. subtilis* LAMI005 at 30°C, 180 rpm for 72 h. Culture medium was composed of clarified cashew apple juice (CCAJ) + ammonium sulfate (1.0 g/L) with different initial substrate concentrations: (A) 12.71 g/L, (B) 48.96 g/L, (C) 65.04 g/L, (D) 96.10 g/L (undiluted juice). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from two independent experiments.

main fermentation products. The change to anaerobic respiration could be induced by the accumulation of acidic compounds such as pyruvate and acetate from fermentation [31].

Some authors suggest [24,32] that biosurfactant production by *B. subtilis* is associated with growth, while other authors observed that the biosurfactant production occurs mainly at the end of the exponential growth phase [33] or at the stationary phase of biomass growth [34]. Several factors are responsible for this behavior, among which we should mention the type of organism being used and the culture medium in which it is grown. Therefore the analysis of the profiles of $\ln(X/X_0)$ versus time (t) and product concentration (P) versus time, during biosurfactant production by *B. subtilis* LAMI005 on CCAJ, supplemented with ammonium sulfate at a concentration of 1.0 g/L, were compared in order to distinguish between the three broad kinetic groups proposed by Elmer and Gaden [35]. Results are shown in Fig. 4, for $S_0 = 65.04.1$ g/L. It can be observed that $\ln(X/X_0) \times t$ and $P \times t$ have similar profiles, in other words, there is a connection between the curves. Production kinetics is parallel to the biomass kinetics to a large extent during logarithmic growth. Similar profiles were obtained for the other initial substrate concentration studied (data not shown). Therefore, in the conditions assayed here, surfactin production by *B. subtilis* LAMI005 is associated with growth.

3.4. Evaluation of the surface activity of the biosurfactant produced by *B. subtilis* LAMI005 cultivated in CCAJ supplemented with ammonium sulfate

The stability of oil/water emulsions is also widely used as an indicator of surface activity, although the ability of a molecule

to form a stable emulsion is not associated with surface tension reduction [36]. The rate of emulsification determines the ability of the biosurfactant to form emulsions, and the ability to stabilize emulsions is also a parameter used to evaluate the surface activity of surfactants. There are some examples in the literature of biosurfactant that both lowered surface tension and stabilized emulsions. On the other hand, some *Bacillus* species produce a type of emulsifier that may not cause an appreciable reduction of the surface tension of water but it is able to form an excellent emulsion with kerosene, for instance [12]. Therefore, the surface activity of biosurfactant produced by *B. subtilis* LAMI005 cultivated in CCAJ supplemented with ammonium sulfate, at different initial substrate concentrations, was characterized by measuring the surface tension, emulsifying activity and emulsification index of the fermented broth free of cells.

Table 3 shows the emulsification index measured at the fermentation time where the highest biosurfactant concentration was achieved, which varied depending on the initial substrate concentration used. The biosurfactant produced by LAMI005 showed high emulsification index ($IE_{24} > 50\%$) on kerosene and soybean oil, but not against gasoline. Most microbial surfactants are substrate specific, solubilizing or emulsifying different hydrocarbons at different rates [37]. Best results for emulsification index (IE_{24}) were obtained by using kerosene (67%), followed by soybean oil (64%). Similar results were obtained by other authors [9], after 72 h of cultivation, 65% of kerosene emulsification was obtained, indicating that this biosurfactant has an emulsifying activity.

The ability to stabilize an emulsion is an indication that the microorganism is producing biosurfactant [38]. Results of emulsifying capacity and stability can be seen in Fig. 5. The biosurfactant

Table 3

Emulsification index (IE₂₄) of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice, supplemented with ammonium sulfate (1.0 g/L) at 30 °C and 180 rpm, using different initial concentrations of substrate (S₀). Experiments were performed in duplicate and the results represent means ± standard deviations of the two independent experiments.

Run	S ₀ (g/L)	Fermentation time (h)	IE ₂₄ (%)		
			Soybean oil	Kerosene	Gasoline
1	12.71 ± 0.05	24	0.0	25 ± 0.0	0.0
2	48.96 ± 0.09	48	58 ± 0.12	67 ± 0.0	37 ± 0.02
3	65.04 ± 0.29	72	53 ± 0.06	66 ± 0.1	26 ± 0.19
4	96.10 ± 1.42	72	64 ± 0.00	67 ± 0.0	0.0

produced by *B. subtilis* LAMI005 showed an emulsification activity higher than 1.0 U, except when S₀ = 12.71 g/L, was used. It is worthwhile that in this condition, low amounts (concentration) of biosurfactant was produced. Higher emulsifying capacity is also observed on the sample collected after 48 h of inoculation. The emulsion stability is always very high and independent of the initial substrate concentration on the culture medium. Results obtained in this work are similar to those described for the synthetic commercial surfactants tested by Amaral et al. [39]. They were also similar to those described to other biosurfactant from *Yarrowia lipolytica* [39], *C. lipolytica* IA [40] and *Nocardia* sp. L-417 [41].

3.5. Minimum surface tension and critical micelle concentration considering the effect of carbon source concentration

It is important to distinguish between an effective biosurfactant and an efficient biosurfactant. Effectiveness is measured by the minimum value to which the surface tension can be reduced, whereas efficiency is measured by the biosurfactant concentration required to produce a significant reduction in the surface tension of water. The latter can be determined from the CMC of the biosurfactant [18]. Moreover, the ability to reduce surface tension below 35 dyne/cm is one of the criteria used to select biosurfactant-producing microorganisms [1]. Several factors influence the type and amount of surfactant, among which we highlight the growing conditions and nutrient availability in the medium [42,43]. In this work, the effect of carbon source concentration on biosurfactant effectiveness and efficiency was investigated. Fig. 6 shows the results of surface tension of the cell-free supernatant along

time for the different experimental conditions evaluated. It can be observed that, in all assays (runs 1–4) *B. subtilis* LAMI005 produced biosurfactant, since surface tension values below 35 dyne/cm were detected.

It is possible to observe in Fig. 6 that as surfactant concentration increases in the culture medium (see Fig. 3B), lower values of surface tension are achieved up to a minimum value (30 dyne/cm). In some cases, when using 65.04 and 96.1 g/L of initial substrate concentration, the surface tension remained almost unaltered from 8/24 h until the end of cultivation. After this time of cultivation, although surfactin concentration continued to grow, no further reduction was observed in the surface tension of the free-cell broth. Similar behavior was observed by other authors [44] and they suggested that the biosurfactant concentration in the broth probably reached or exceeded its CMC at this cultivation time. According to the literature [18], as surfactant concentration increases the surface tension of the surfactant solution decreases up to a certain value and then becomes almost constant due to the interface saturation with the surfactant molecules. Barros et al. [23], working with *B. subtilis* LB5, grown in cassava wastewater, report that the biosurfactant tested exhibited excellent surface activity, reducing the tension of water from 72.31 to 27.01 dyne/cm. Queiroga et al. [45] using *B. subtilis* for the production of biosurfactant in the presence of oil, reported a reduction in surface tension of the fermented broth from 53 dyne/cm to 25.7 dyne/cm. Gouveia et al. [46], working with 13 biosurfactant-producing strains, and using glycerol and glucose as carbon source, observed a reduction in surface tension of the medium from 58 dyne/cm to 30 dyne/cm. In this work, the produced surfactin showed to be a highly effective biosurfactant since its crude solution could lower the surface tension of the fermented broth to 30 dyne/cm. However, it was documented that surfactin can lower the surface tension to even lower values, reaching 27 dyne/cm [1]. This contradiction may be attributed to the low purity of the surfactin preparation, since it was not extracted from the culture medium.

By definition, the CMC is the surfactant concentration at which an abrupt increase in surface tension is observed. Regardless of the surfactant concentration, a further decrease in the surface tension will not be observed once the CMC has been reached [22]. Zhang and Miller [47] reported that the concentration of biosurfactant required to reach the CMC is typically between 1 and 200 mg/L, while the interfacial tension (oil/water) is around 1 and 30 dyne/cm [48]. Table 4 shows the critical micelle concentration (CMC) of surfactin produced by *B. subtilis* LAMI005 at this work, as well as SDS and several biosurfactant isolated from different *B. subtilis* strains, including a standard sample (surfactin from Sigma–Aldrich).

It can be observed in Table 4 that surface active compounds can reduce the surface tension of water to values around 27–37 dyne/cm and their CMCs range from 15 to 180 mg/L. Purified surfactin (standard) is even more efficient since its CMC could reach 7.8 mg/L, see Table 4. Variations in the values of CMC (13, 22, and 17 mg/L) for surfactin have been described by other authors [51–53]. The literature [4,52] reports that these variations are observed depending on the nature of the solvent used to dissolve

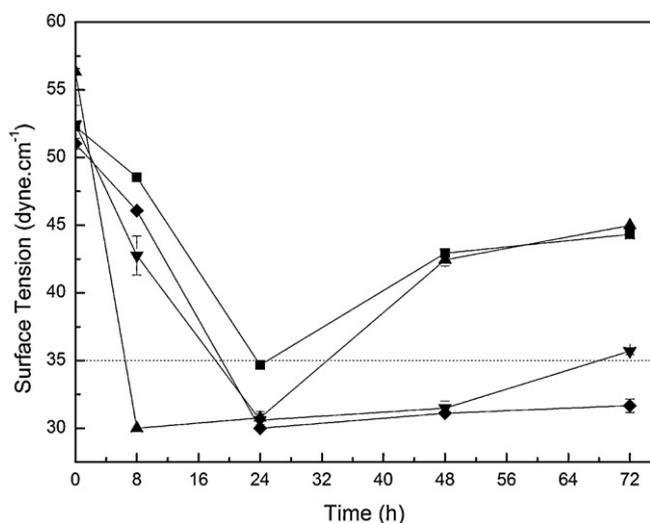


Fig. 6. Surface tension of the fermented broth free of cells after 72 h of fermentation of clarified cashew apple juice (CCAJ) + ammonium sulfate (1.0 g/L) with different initial substrate concentrations: (■) 12.71 g/L, (▲) 48.96 g/L, (▼) 65.04 g/L, (◆) 96.10 g/L (undiluted juice). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from two independent experiments.

Table 4
Minimal surface tensions and critical micelle concentration (CMC) obtained for several surface active compounds. Experiments were performed in duplicate and the results represent means \pm standard deviations of the two independent experiments.

Surfactant	Surface tension (dyne/cm)	CMC (mg/L)	Reference
Run 1 – $S_0 = 12.71$ g/L	34.7 ± 0.0	10.24	This work
Run 2 – $S_0 = 48.96$ g/L	30.0 ± 0.0	16.90	This work
Run 3 – $S_0 = 65.04$ g/L	30.6 ± 0.5	63.00	This work
Run 4 – $S_0 = 96.10$ g/L	30.0 ± 0.0	21.41	This work
SDS (synthetic)	37.0	2.888	[49]
Surfactin from <i>Bacillus subtilis</i> isolate bs5	42.5	15.6	[18]
Surfactin from <i>Bacillus subtilis</i>	27	25.0	[32]
Standard surfactin (Sigma–Aldrich)	27	$7.8\text{--}20.7^a$	[50]

^a CMC = $7.5\text{--}20$ $\mu\text{mol/L}$ and molecular weight = 1036.34 g mol [50].

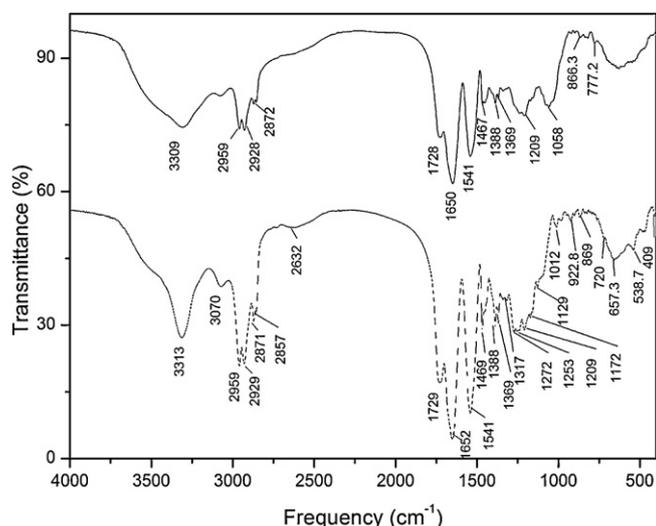


Fig. 7. A comparison of vibrational spectroscopy in the infrared region – FT-IR, spectrograms of standard surfactin (dashed line) and semi-purified extracellular biosurfactant (solid line) produced by *B. subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice (CCAJ) supplemented with ammonium sulfate (1.0 g/L) at 30°C , 180 rpm and $S_0 = 65.04$ g/L.

surfactin as well as the purity of surfactin preparation. By comparison, the results obtained in this work are in agreement with those obtained from the literature, which shows the potential of using CCAJ as a carbon source for surfactin production by *B. subtilis* strains.

3.6. Chemical structure of the surfactin produced by *B. subtilis* grown in clarified cashew apple juice

Fig. 7 shows the infrared spectrum of the *B. subtilis* LAMI005 biosurfactant and the spectrum of a standard sample of surfactin from *B. subtilis* (Sigma–Aldrich, 95% purity). In both spectra it is possible to observe bands characteristic of peptides (wave number 3430:NH , wave number 1655:CO , and wave number 1534:CN) and aliphatic chains (wave number $3000\text{--}2800$, CH_2 and CH_3), indicating that this compound is a lipopeptide. A band corresponding to an ester carbonyl group (wave number 1730:CO) is also observed. Similar results were obtained by other authors [54] when determining the chemical structure of the surfactant produced by *Bacillus licheniformis*. No significant difference in IR spectra of the biosurfactant produced in this work or the standard sample is observed.

4. Conclusions

B. subtilis LAMI005 was capable to grow and to produce biosurfactant in an alternative culture media, prepared by using clarified cashew apple juice, an agroindustrial by-product of the cashew

industry, supplemented with ammonium sulfate. Since economic considerations are one of the main problems concerning the expansion of the biosurfactant market, CCAJ appears as an alternative water soluble low cost medium. Based on the literature [7], this result is interesting once water-soluble substrates are cheaper than hydrocarbons and are preferred because single-phase fermentation is simpler than biphasic fermentation. Analyses of the culture supernatants along cultivation time showed that surfactin production was influenced by the amount of CCAJ used to prepare the culture medium, reaching a maximum concentration of 319.3 mg/L. Furthermore the emulsification index (IE_{24}) value of the biosurfactant was found to be 65% demonstrating its capacity to emulsify kerosene and soybean oil. The biochemical analysis of the semi-purified biosurfactant indicates that surfactin was produced by *B. subtilis* LAMI005 under the conditions assayed in this work.

Acknowledgments

The authors kindly acknowledge the financial aid and research scholarships given by Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] C.N. Mulligan, Environmental applications for biosurfactants, Environ. Pollut. 133 (2005) 183–198.
- [2] J.D. Desai, I.M. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61 (1997) 47–64.
- [3] F. Peypoux, J.M. Bonmatin, J. Wallach, Recent trends in the biochemistry of surfactin, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51 (1999) 553–563.
- [4] S.L. Fox, G.A. Bala, Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates, Bioresour. Technol. 75 (2000) 235–240.
- [5] S.S. Cameotra, R.S. Makkar, Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50–5 (1998) 520–529.
- [6] E. Rosenberg, E.Z. Ron, High and low-molecular-mass microbial surfactants, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 (1999) 154–162.
- [7] M. Nitschke, G.M. Pastore, Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater, Bioresour. Technol. 97 (2006) 336–341.
- [8] Cashew agroindustry. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201101.pdf (accessed 11.04.12).
- [9] M.V.P. Rocha, R.V. Gomes-Barreto, V.M.M. Melo, L.R.B. Gonçalves, Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008, Appl. Biochem. Biotechnol. 155 (2009) 63–75.
- [10] L.C.M. Neves, K.S. Oliveira, M.J. Kobayashi, T.C.V. Penna, A. Converti, Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media, Appl. Biochem. Biotechnol. 136–140 (136) (2007) 539–540.
- [11] M.E.A. Giro, J.J.L. Martins, M.V.P. Rocha, V.M.M. Melo, L.R.B. Gonçalves, Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor, J. Biotechnol. 4 (2009) 738–747.
- [12] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface-active agents from two *Bacillus* species, Appl. Environ. Microbiol. 53–2 (1987) 224–229.
- [13] M.M.P. Rocha, A.H.S. Oliveira, M.C.M. Souza, L.R.B. Gonçalves, Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*, World J. Microbiol. Biotechnol. 22 (2006) 1295–1299.

- [14] M.C. Cirigliano, G.M. Carman, Isolation of a nioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (4) (1984) 747–750.
- [15] S.G.V.A.O Costa, M. Nitschke, R. Haddad, M.N. Eberlin, J. Contiero, Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils, *Process Biochem.* 41 (2006) 483–488.
- [16] M.S. Yeh, Y.H. Wei, J.S. Chang, Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers, *Biotechnol. Progr.* 21 (2005) 1329–1334.
- [17] L.M. Santa Anna, G.V. Sebastian, N. Pereira Jr., T.L.M. Alves, E.P. Menezes, D.M.G. Freire, Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93 (2002) 459–467.
- [18] A.M. Abdel-Mawgoud, M.M. Aboulwafa, N.A.-H. Hassouna, Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150 (2008) 289–303.
- [19] H.S. Fogler, M.N. Gürmen, *Elements of Chemical Reaction Engineering*, 2nd ed., 1992.
- [20] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, Production of biosurfactant at mesophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1998) 48–52.
- [21] E.J. Gudina, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*, *Colloid Surf. B* 76 (2010) 298–304.
- [22] H.B.S. Sobrinho, R.D. Rufino, J.M. Luna, A.A. Salgueiro, G.M. Campos-Takaki, L.F.C. Leite, L.A. Sarubbo, Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995, *Process Biochem.* 43 (2008) 912–917.
- [23] F.F.C. Barros, C.P. Quadros, G.M. Pastore, Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira, *Ciênc. Tecnol. de Aliment., Campinas* 28–4 (2008) 979–985.
- [24] H. Kim, B. Yoon, C. Lee, H. Suh, H. Oh, T. Katsuragi, Y. Tani, Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, *J. Ferment. Bioeng.* 84 (1) (1997) 41–46.
- [25] F.A.S.L. Reis, E.F.C. Sérvulo, F.P. De França, Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113–116 (2004) 899–912.
- [26] Y.-H. Wei, L. Wang, J.-S. Chang, S.-S. Kung, Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation, *J. Biosci. Bioeng.* 96 (2003) 174–178.
- [27] C.J.B. Lima, E.J. Ribeiro, E.F.C. Servulo, M.M. Resende, V.L. Cardoso, Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152 (2009), 156.
- [28] D.A. Davis, H.C. Lynch, J. Varley, The production of surfactin culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism, *Enzyme Microb. Technol.* 25 (1999) 322–329.
- [29] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources—a review, *J. Surf. Deterg.* 2 (1999) 237–241.
- [30] C. Sandrin, F. Peypoux, G. Michel, Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12 (1990) 370–375.
- [31] H.C. Ramos, T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Laser, J. Jahn, Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression, *J. Bacteriol.* 182–11 (2000) 3072–3080.
- [32] D.G. Cooper, C.R. MacDonald, S.J.B. Duff, N. Kosaric, Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition, *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 408–412.
- [33] O.D. Sheppard, C.N. Mulligan, The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 (1987) 110–116.
- [34] H.S. Kim, J.W. Jeon, B.H. Kim, C.Y. Ahn, O.-H. Mock, B.D. Yoon, Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation D, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006) 391–396.
- [35] L. Elmer, Gaden Jr., Fermentation process kinetics, *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.* 1–4 (1959) 413–429.
- [36] N.H. Youssef, K.E. Duncan, D.P. Nagle, K.N. Savage, R.M. Knapp, M.J. Mcinerney, Comparison of methods to detected biosurfactant production by diverse microorganisms, *J. Microbiol. Methods* 56 (2004) 339–347.
- [37] M.O. Ilori, A.C. Amobi, A.C. Odocha, Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment, *Chemosphere* 61 (2005) 985–992.
- [38] S.B. Batista, A.H. Mounteer, F.R. Amorim, M.R. Totola, Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 868–875.
- [39] P.F.F. Amaral, J.M. Silva, M. Lehoc, A.M.V. Barros-Timmons, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochem.* 41 (2006) 1894–1898.
- [40] L.A. Sarubbo, M.C.R. Marçal, M.L.C. Neves, M.P.C. Silva, A.L.F. Porto, G.M. Campos-Takaki, Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95 (2001) 59–67.
- [41] S.H. Kim, E.J. Lim, S.O. Lee, J.D. Lee, T.H. Lee, Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 (2000) 249–253.
- [42] C. Sylđatk, S. Lang, U. Matulovic, F. Wagner, Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874, *Z. Naturforsch.* 40C (1985) 61–67.
- [43] M. Benincasa, J. Contiero, M.A. Manresa, I.O. Moraes, Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, *J. Food Eng.* 54 (2002) 283–288.
- [44] S. Pansiripat, O. Pornsunthorntawe, R. Rujiravanit, B. Kitiyanan, P. Somboonthanate, S. Chavadej, Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: effect of oil-to-glucose ratio, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 185–191.
- [45] C.L. Queiroga, L.R. Nascimento, G.E. Serra, Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil, *Braz. J. Microbiol.* 34–4 (2003) 321–324.
- [46] E.R. Gouveia, D.P.A. Lima, M.S. Duarte, G.M. Souza Lima, J.M. Araujo, Bactérias produtoras de biosurfactantes, *Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenv.* 30 (2003) 39–45.
- [47] Y. Zhang, R.M. Miller, Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3276–3282.
- [48] G. Bognolo, Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloid Surf. A* 52 (1999) 41–52.
- [49] K. Das, A.K. Mukherjee, Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants, *Process Biochem.* 42 (2007) 1191–1199.
- [50] Sigma-Aldrich, Product Details: Surfactin from *Bacillus subtilis* (S3523), 2011, http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=S3523|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (accessed 06.06.11).
- [51] R. Sen, T. Swaminathan, Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin, *Process Biochem.* 40 (2005) 2953–2958.
- [52] C. Carrillo, J.A. Teruel, F.J. Aranda, A. Ortiz, Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin, *Biochim. Biophys. Acta* 1611 (2003) 91–97.
- [53] T. Kikuchi, K. Hasumi, Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1596 (2002) 234–245.
- [54] S.C. Lin, K.S. Carswell, M.M. Sharma, G. Georgiou, Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 (1994) 281–285.

Characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice

Darlane Wellen Freitas de Oliveira¹, Ítalo W. L de França¹, Vânia M.M. Melo¹,
Luciana Rocha Barros Gonçalves¹, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

Abstract

Surface active agents or surfactants are an important class of chemicals widely used in various industrial sectors. The biosurfactants are gaining attention in recent years because of some advantages over synthetic surfactants such as biodegradability, low toxicity, diversity of applications and functionality under extreme conditions. Microbial biosurfactants are useful in bioremediation of water and soil, enhanced oil recovery, and in many formulations of petrochemical, chemical, pharmaceutical, food, cosmetic and textile industries. Concerning disadvantages, one of the problems is related to large scale and cheap production of biosurfactants. Large quantities are particularly needed in petroleum and environmental applications, which, due to the bulk use, may be expensive. To overcome this problem, processes should be coupled to utilization of waste substrates combating at the same time their polluting effect, which balances the overall costs. The objective of this work was to produce and characterize the surfactant synthesized by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. The culture media was prepared by using ammonium sulfate as nitrogen source and clarified cashew apple juice as a carbon source, an agricultural residue from the cashew nut industry, typical of the northeast region of Brazil. *Bacillus subtilis* LAMI005 was isolated from the tank of chlorination at the Wastewater Treatment Plant on Campus do Pici (WWTP-PICI) in the Federal University of Ceará, Brazil. The tests were conducted at 30°C with agitation of 180 rpm for 72 hours. The fermentation media was centrifuged at 4°C, 10000 g, for 15 minutes to remove cells. The fermented broth free of cells was analyzed for the submental surface tension, emulsification index, concentration of surfactin, substrate consumption and biomass concentration, to further characterization of surfactin. Preliminary results shows surfactin concentrations around 350 mg/L, biomass concentration of 5 g/L and surface tension decreasing from 53.72 ± 0.9 to 29.0 ± 0.99 dyne/cm (around 49% of reduction on surface tension). Emulsification index was 43 ± 0.0 and 48 ± 0.0 using soy bean oil and kerosene, respectively. This results shows that *Bacillus subtilis* LAMI005 is a good producer of surfactin and clarified cashew apple juice is a suitable medium for biosurfactant production.

Influence of agitation on the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* grown in clarified cashew apple juice

J.A.M. Apolônio¹, D.W.F. Oliveira¹, I.W.L. de França¹, A.K.N. Felix¹, V.M.M. Melo², L.R.B. Gonçalves¹. *Chemical Engineering Department, Universidade Federal do Ceará*¹, *Biology Department, Universidade Federal do Ceará*²,
Fortaleza/Brazil.

The biosurfactants are gaining attention in recent years because of some advantages over synthetic surfactants such as biodegradability, low toxicity, diversity of applications and functionality under extreme conditions. The use of agro-industrial residues as substrates may contribute to reduced costs, since the culture medium represents approximately 30% of the final product. The objective of this work was to study the influence of agitation in the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. The culture media was prepared by using ammonium sulfate as nitrogen source and clarified cashew apple juice as a carbon source, an agricultural residue from the cashew nut industry, typical of the northeast region of Brazil. *Bacillus subtilis* LAMI005 was isolated from the tank of chlorination at the Wastewater Treatment Plant on Campus do Pici (WWTP-PICI) in the Federal University of Ceará, Brazil. Preliminary results at 30 °C, 150 rpm for 72 hours showed a decrease in surface tension of the culture broth free of cells to 31.32 ± 0.08 dyne/cm. At 180 rpm, under the same conditions of temperature and time, surface tension was at the end of the essay was 28.68 ± 0.99 dyne/cm. This results shows that *Bacillus subtilis* LAMI005 is a good producer of surfactin and clarified cashew apple juice is a suitable medium for biosurfactant production. Furthermore, there is a positive effect on biosurfactant production with the increase in agitation rate.

Influence of pH on the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice

Darlane Wellen F. de Oliveira^a, Ítalo Waldimiro L. de França^a, Diana P. Bezerra^a, Juliana Alves M. Apolônio^a, Anne Kamilly N. Felix^a, Vânia M. M. Melo^b and Luciana Rocha B. Gonçalves^{a,*}

^aDepartamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará - UFC, Campus do Pici, 60440-554, Fortaleza, Brasil

^bDepartamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará - UFC, Campus do Pici, 60440-554, Fortaleza, Brasil

*lrg@ufc.br

Introduction

Biosurfactants are an important class of chemical compounds widely used in many industrial sectors, with the important features of the easy biodegradability, low toxicity and, therefore, easy for ecological acceptability act as dispersants and/or solubilising organic compounds, with low water solubility, ability to act in drastic conditions of temperature or pH [1,2,3].

Although biosurfactants exhibit important advantages, they have not been yet employed extensively in industry because of relatively high production costs. One possible strategy for reducing costs is the utilization of alternative substrates, such as agro industrial wastes, for biosurfactant production. Cashew apple juice, for instance, due to its vast availability and high concentration of reducing sugars, may be a suitable raw material for surfactant production by *Bacillus subtilis* strains [4].

Materials and Methods

Microrganism and culture media: *Bacillus subtilis* LAMI005 described elsewhere [4] was investigated for biosurfactant production. Clarified cashew apple juice (CCAJ) was diluted with water, supplemented with 1,0 g/L of (NH₄)₂SO₄ (as nitrogen source) and used as culture medium. The pH of the medium was adjusted to 5.0, 6.0, 7.0 or 8.0, depending on the essay, with HCl (3M) or NaOH (3M) and it was sterilized at 110°C for 10 minutes.

Batch fermentation for biosurfactant production: Biosurfactant production was conducted in Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 50 ml aliquots of the culture medium and the experiments were carried out in a rotary shaker (Tecnal – TE240) at 180 rpm, 30°C for 30h. Assays were conducted in duplicate.

Biomass concentration: cell concentration was determined by an indirect method, turbidimetry, using a UV visible spectrophotometer (Genesys 20 series) at 600 nm. Biomass (g/L) was determined using a calibration curve of biomass x optical density [4].

Concentration of total reducing sugars (TRS): TRS was determined by HPLC using a Supelcogel C610H (30 cm x 7.8 mm) column (Sigma Aldrich, USA) using 0.1% H₃PO₄ in deionized water as mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min described elsewhere [4].

Surfactin concentration: Surfactin concentration was measured by HPLC using a Waters high-performance-liquid chromatographer equipped with a UV detector (Model 2487, Waters), at 205 nm, and a Symmetry C18 column (150 × 4.6mm, 5µm, Waters, Ireland), using 20% v/v TFA (3.8mM) and 80% v/v acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 1mL/min at 30°C described elsewhere [4].

Surface Tension Determination: Surface tension was determined by a Tensiometer (Kruss K6) at 30°C, according to the De Nöuy ring method [5]. The surface tension determination was replicated at least three times and it was performed using cell-free supernatants. Cells were removed by centrifugation at 10,000 g for 20min.

Results and Discussion

The influence of pH on bisurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice supplemented with with 1,0 g/L of (NH₄)₂SO₄ was investigated. Figure 1 show the experimental results of cell and surfactin concentration, as well as substrate conversion and surface tension of the fermented broth free of cells.

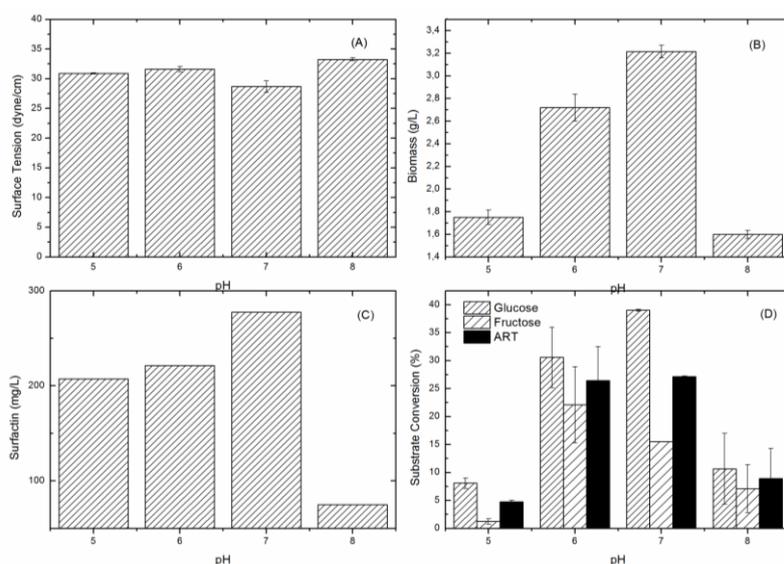


Figure 1 – Influence of the pH of the culture medium on the surface tension of the broth free of cells (A), biomass concentration (B), surfactin concentration (C) and substrate conversion (D) during biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice (Initial sugar concentration $\approx 20 \text{ g.L}^{-1}$).

As shown in Figure 1, *Bacillus subtilis* LAMI005 was able to grow and produce biosurfactant at different pH values (5–8). Surface tension values were low (less than 35 dyne/cm) for most of the assays, indicating biosurfactant production. It can be observed that biomass and surfactin concentration increased with increasing values of pH, up to pH = 8, when they decreased. Substrate conversion was higher at pH 6 and 7, when higher concentrations of surfactin were also observed. The optimal production of biosurfactant was observed at pH 7, more than 275 mg/L of surfactin. At pH 5 and 6, almost 205 and 225 mg/L was produced respectively. The same result was obtained by other authors [6] when studying biosurfactant production by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at Different pH values in the Medium, ranging from 4.5 to 10.5. Furthermore, surfactin production was maintained over a pH range (5–7). At pH 5 and 6, almost 205 and 225 mg/L was produced, respectively. Surfactin concentration achieved at pH 7 was only 1.3-fold higher than the concentration obtained at pH 5. These findings suggest that biosurfactants can be effectively used for large-scale production where unexpected changes in pH can occur [7].

References

- [1] J.D. Desai and I. M. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1997) 61, 47-64.
- [2] Mulligan, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, (2005), v.133, p. 183-198.
- [3] Yeh, M. S.; Wei, Y. H. Chang, J.S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, (2006), v. 41, p. 1799-1805.
- [4] 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*, (2009), v. 4, p. 738–747.
- [5] Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N. et al., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *PROCESS BIOCHEMISTRY*, (2006), 41, 483–488.
- [6] Makkar, R.S., Cameotra, S.S. Effects of Various Nutritional Supplements on Biosurfactant Production by a Strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, (2002), 5, 11-17.
- [7] Pruthi, V. and Cameotra, S.S. Effect of Nutrients on Optimal Production of Biosurfactants by *Pseudomonas putida* - A Gujarat Oil Field Isolate. *Journal of Surfactants and Detergents*, (2003), 6, 65-68.



Produção de Biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005: Avaliação do Meio de Cultivo

Darlane Wellen Freitas de Oliveira¹, Italo Waldimiro Lima de França¹, Anne Kamilly Nogueira Felix¹, Juliana Alves M. Apolônio¹, Diana Pereira Bezerra¹, Vânia Maria M. Melo² e Luciana Rocha Barros Gonçalves¹

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Bloco 709, Campus do Pici – CEP. 60.455-760, Fortaleza – CE, *e-mail: darlannefreitas@gmail.com; lrg@ufc.br.

²Universidade Federal do Ceará – Depto. de Biologia - LemBiotech - Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia - Bloco 909, Campus do Pici – CEP. 60.455-760, Fortaleza – CE.

RESUMO

Estudou-se a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado como meio de cultivo (CAJC), adicionando-se diversos nutrientes para avaliação da melhor condição de produção. Conduziram-se os ensaios em shaker a 30°C, 180 rpm, por 72 horas. Obtiveram-se melhores resultados utilizando suco de caju clarificado suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Meio A) e suco de caju clarificado suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e solução de micronutrientes (Meio B). As concentrações de surfactina obtidas foram de, respectivamente, 178 mg.L^{-1} e 219 mg.L^{-1} . A tensão superficial apresentou-se em torno de 30 dina/cm, com redução da tensão em torno de 45% (Meio A) e em torno de 33 dina/cm com redução em torno de 40% quando o meio foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e solução de micronutrientes (Meio B). O presente estudo mostrou ser viável a bioconversão do suco de caju clarificado suplementando apenas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a produção de biossurfactantes por *B. subtilis*.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, suco de caju clarificado, biossurfactantes.

INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção polar solúvel em água, pode ser iônica, não iônica ou anfotérica, ou seja, exibir características aniônicas ou catiônicas dependendo das condições de pH da solução aquosa na qual estão inseridos, e outra apolar, que é geralmente um hidrocarboneto, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios (DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes são produzidos por biotransformação de matérias-primas renováveis, podendo ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Apresentam grande diferença em relação aos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica, além da vantagem de baixos impactos ambientais em relação aos detergentes químicos convencionais (BANAT *et al.*, 2000). São aplicados em



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

diversos campos da agricultura, da construção, de indústrias alimentícias, de bebidas, petróleo, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN *et al.*, 2001). Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (DESAI; BANAT, 1997).

O uso de substratos alternativos, ricos em carboidratos ou lipídios para crescimento do microrganismo e biossíntese dos biossurfactantes, reduzem os custos de fabricação, viabilizando a obtenção de produtos economicamente viáveis. Considerando os resíduos do caju da agroindústria do estado do Ceará, o suco de caju é um potencial substrato a ser estudado, uma vez que é uma matéria-prima rica em carboidratos, fibras, vitaminas e sais minerais de grande abundância na região Nordeste (ROCHA *et al.*, 2006).

Visando uma alternativa de aproveitamento para o pedúnculo de caju, o presente estudo objetivou avaliar diferentes meios de cultivo tendo como principal fonte para o metabolismo do microrganismo o suco de caju clarificado para a produção de biossurfactantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima: utilizou-se suco de caju clarificado como meio de cultivo, a partir de cajus (*Anacardium occidentale* L), previamente processados na Embrapa Agroindústria Tropical na Universidade Federal do Ceará, de acordo com algumas etapas da metodologia de Melo *et al.*, (2000).

Microrganismo: utilizou-se o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, isolado de um tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do *Campus* do Pici da Universidade Federal do Ceará (ETE-PICI). Esta linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Meios de cultura: A linhagem foi mantida em meio APGE conforme descrito em Giro *et al.* (2009) e os ensaios fermentativos foram realizados utilizando suco de caju clarificado (CAJC) suplementado com sulfato de amônio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) como fonte de nitrogênio com concentração inicial de açúcares redutores totais (ART) em torno de 40 g.L^{-1} .

Inóculo: Três colônias de *B. subtilis* LAMI005 foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (CAJC) com concentrações iniciais de ART em torno de 20 g.L^{-1} e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio, incubados em shaker rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brazil) a 180 rpm a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por ± 40 horas. Os meios de cultivo e o meio para inóculo foram ajustados para pH 7,0 e esterilizados em autoclave a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min.

Ensaio fermentativo em shaker rotatório: Utilizou-se um *shaker* rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil). Os ensaios fermentativos foram conduzidos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm, durante 30 horas e os melhores resultados foram reproduzidos por 72 horas, em triplicata, em erlenmeyers de 250 mL, contendo o meio de cultivo com adição de 10% v/v de inóculo em fase exponencial de crescimento, tendo volume total de meio de cultivo de 50 mL. Foram retiradas amostras nos tempos de zero, 08, 24, 48 e 72 horas para posteriores análises. Avaliou-se cinco meios de cultivo distintos.

Extração de surfactina: Foi realizada de acordo com metodologia de Nitschke e Pastore (2006), com algumas modificações: separou-se células do meio por centrifugação a 10.000 g por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

Determinação da concentração de biomassa: O crescimento celular foi determinado pelo método indireto por turbidimetria conforme descrito em Giro *et al.* (2009).

Tensão superficial: Foi determinada, no caldo fermentado livre de células, utilizando um Tensiômetro (Krüss K6) a 30 °C, de acordo com o método do anel de Du Nöuy (Costa *et al.*, 2006).

Determinação da concentração de surfactina: Foi determinada em HPLC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Oliveira, 2010.

Concentração de carboidratos: A concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme descrito por Oliveira *et al.*, 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliou-se a influência da suplementação de diferentes nutrientes para o crescimento microbiano e na produção de surfactina em ensaios conduzidos em batelada por 30 horas, visando uma comparação entre os meios, denominados A, B, C, D e E conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo utilizados para os ensaios A, B, C, D e E realizados em *shaker* a 30°C e 180 rpm, por 30 horas utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 com concentração de ART em torno de 40 g.L⁻¹.

Ensaios	Composição	Concentração
A	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹
B	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ *Solução de Micronutrientes	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 0,1%
C	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ NaCl	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 2,7 g.L ⁻¹
D	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 0,6 g.L ⁻¹
E	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 7,2 g.L ⁻¹ 3,0 g.L ⁻¹

*Solução de micronutrientes: conforme descrita em Oliveira, 2010.

A Figura 1 mostra a tensão superficial do caldo fermentado livre de células, a concentração de biomassa, a conversão de substrato e a formação de produto (surfactina), após 30 horas de fermentação para os meios de cultivo A, B, C, D e E.

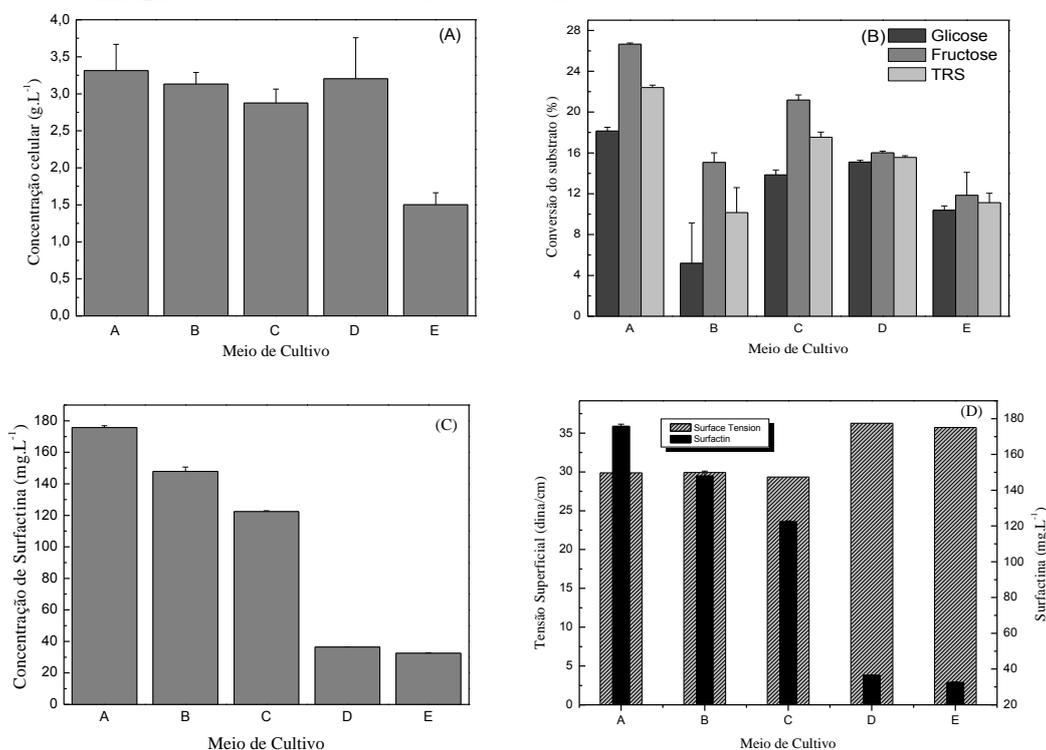
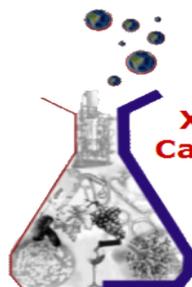


Figura 1 –Perfil do crescimento celular (A), conversão do substrato (B), produção de surfactina (C) e tensão superficial x concentração de surfactina (D) em função do tempo para ensaios realizados em *shaker* utilizando *Bacillus Subtilis* LAMI005 cultivado em meio contendo suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART \pm 40 g.L^{-1} utilizando os meios de cultivo A, B, C, D e E.

Maiores valores de conversão de substrato nos ensaios A e C foram obtidos, ver Figura 1. Porém os melhores resultados de formação de produto foram obtidos nos ensaios A e B, obtendo-se concentração de surfactina em torno de 175 mg.L^{-1} no ensaio A e 145 mg.L^{-1} no ensaio B. As concentrações de biomassa obtidas nos ensaios A e B foram em torno de 3,2 g.L^{-1} e 3,0 g.L^{-1} , respectivamente. A Figura 1 mostra ainda os valores de tensão superficial, medida indireta para determinar a produção de biossurfactantes, para os meios de cultivo A, B, C, D e E.

Como os Ensaios A e B apresentaram melhores resultados em apenas 30 horas de ensaio, resolveu-se avaliar a produção de biossurfactantes com os respectivos meios de cultivo por 72 horas. A Figura 2 mostra o perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para os ensaios A e B, respectivamente.

Ambos os ensaios apresentaram significativo crescimento celular, com concentrações de biomassa de 7,5 g.L^{-1} (A) e 7,0 g.L^{-1} (B), ambas no tempo de 72 horas. Observando o consumo de substrato, verificou-se que o microrganismo mostrou preferência por glicose no ensaio A e consumo simultâneo de glicose e frutose no ensaio B, não havendo consumo total do substrato. O fato de haver carbono residual pode ser explicado devido a presença de diversos nutrientes no suco de caju como diversos aminoácidos e proteínas, além de sais minerais como manganês, potássio, ferro, zinco e estes podem desviar a preferência do microrganismo das principais fontes de carbono, glicose e frutose, deixando assim uma certa quantidade residual destas duas fontes. A maior concentração de surfactina no ensaio A foi no tempo 48 horas, concentração em torno de 178 mg.L^{-1} . A pequena redução da concentração de

surfactina na amostra de 72h de ensaio provavelmente deve-se ao efeito de precipitação causado quando a mesma se encontra em meio ácido, ou melhor, a acidez mascara a verdadeira concentração de surfactina, por haver precipitação do biossurfactante em meio ácido, pois verifica-se que o pH do presente ensaio (Figura 2 A) estava em torno de 6,5, decrescendo a partir de 24h e chegando até pH 4,0 ao fim de 72h.

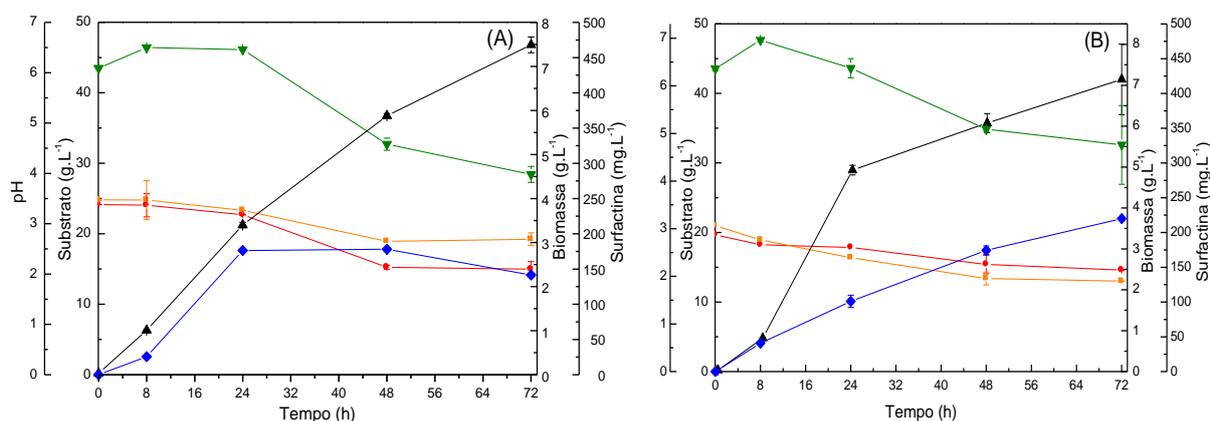


Figura 2 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC); Concentrações iniciais de ART: Ensaio A: 48,96 g.L⁻¹ + sulfato de amônio (1,0 g.L⁻¹); Ensaio B: 40,65 g.L⁻¹ + 1,0 g.L⁻¹ + 0,1% de solução de micronutrientes. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

A concentração de surfactina mostrada na Figura 2 (B) apresentou aumento ao longo do tempo, atingindo concentrações em torno de 219 mg.L⁻¹ após 72 horas de fermentação. Verificou-se que o pH chegou a valores em torno de 5,0, mas não causou diminuição na concentração de surfactina, apesar de estar em faixa ácida. Obteve-se no presente ensaio uma concentração de biossurfactantes um pouco maior que a obtida no Ensaio A. Essa diferença pode ser justificada tanto pela concentração inicial de ART que é um pouco diferente de um Ensaio para outro, quanto pela acidificação ocorrida no Ensaio A, que pode ter ocasionado a precipitação da surfactina, impossibilitando a quantificação correta, no entanto o meio de cultivo A é mais economicamente viável. A Tabela 2 mostra os resultados de tensão superficial para os ensaios com os meios de cultivo A e B.

Tabela 2 – Tensão Superficial (TS) dos ensaios realizados em *shaker* a 30°C e 180 rpm, utilizando *B. subtilis* LAMI005 cultivado em suco de caju clarificado, onde: Ensaio (1): ART 48,96 g.L⁻¹; Ensaio (2): ART 40,65 g.L⁻¹ + micronutrientes; MC: meio de cultura antes do inóculo (branco); TS: Tensão Superficial.

Tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2
	TS (dina/cm)	TS (dina/cm)
MC	56,33 ± 0,2	59,39 ± 0,5
0	56,33 ± 0,2	55,08 ± 0,2
8	30,00 ± 0,0	37,00 ± 0,0
24	30,77 ± 0,5	33,33 ± 0,3
48	42,45 ± 0,5	34,07 ± 0,2
72	44,98 ± 0,0	33,50 ± 1,2



Pode-se verificar que ocorreu uma significativa redução na tensão superficial ao longo do tempo para os ensaios realizados. Obteve-se valores de até 30 dina/cm. Esse fator é um indício claro da produção de biossurfactante pelo microrganismo, uma vez que tensões superficiais abaixo de 35dina/cm indicam que o microrganismo em questão é um bom produtor de surfactina (Mulligan *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

O biossurfactante produzido no meio de cultivo contendo suco de caju clarificado como fonte de carbono suplementado com 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, foi capaz de reduzir a tensão superficial abaixo de 30 dina.cm⁻¹, emulsionou bem diversos hidrocarbonetos e apresentou significativas concentrações de surfactina. O ensaio com adição de solução de micronutrientes apresentou uma produção de biossurfactante um pouco maior que o ensaio sem adição da solução supracitada, porém esta diferença pode ter acontecido devido a diferença das concentrações iniciais de ART de um ensaio para outro, bem como devido a acidificação do meio (A) ao logo do processo fermentativo, que ocasiona precipitação da surfactina, interferindo nos resultados de quantificação da mesma. O meio utilizando suco de caju clarificado como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio foi considerado a mais viável, pois apresentou uma boa produção de biossurfactantes, além de possuir uma composição simples e de baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 53, p. 495-508.
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A*, v. 52, p. 41 – 52.
- Desai, J. D.; Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-64.
- Giro, M. E. A.; Martins, J. J. L.; Rocha, M. V. P.; Melo, V. M. M.; Gonçalves, L. R. B. (2009). 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.
- Melo, C.S.; Mayorga, R.D.; Mayorga, I. O.; Paula Pessoa, P.F.A. (2000). Subsídios à gestão empresarial na busca de competitividade: o caso do mel clarificado de caju. *Revista Econômica do Nordeste*, Fortaleza, v. 31, n. 4, p.1050-1058.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v.133, p. 183-198.
- Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, v. 60, p. 371.
- Oliveira, D. W. F. ; França, I.W.L. ; Martins, J. J. L. ; Montenegro, D. L. ; Giro, M. E. A. ; Melo, V. M. M. ; Gonçalves, L. R. B. . Estudo cinético da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, 2010, Foz do Iguaçu – Brasil.
- Oliveira, D. W. F. (2010). Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, Brasil.
- Rocha, M. V. R.; Oliveira, A. H. S.; Souza, M. C. M.; Gonçalves, L. R. B. (2006). Natural Cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 1295-1299,



INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR LINHAGENS DE *Bacillus sp.*

D. W. F. OLIVEIRA¹, I. W. L. FRANÇA¹, D. P. BEZERRA², V. M. M. MELO³, L. R. B. GONÇALVES¹.

¹Universidade Federal do Ceará – UFC, Departamento de Engenharia Química

²Universidade Federal do Ceará – UFC, Departamento de Engenharia de Alimentos

³Universidade Federal do Ceará – UFC, Departamento de Biologia

E-mail para contato: darlannefeitas@gmail.com

RESUMO – Surfactantes são compostos tensoativos que apresentam atividade na superfície da interface entre duas fases, tais como ar-água, óleo-água, e na superfície de sólidos. Microrganismos sintetizam compostos com propriedades surfactantes como subprodutos metabólicos, sendo neste caso denominados biosurfactantes. Esses compostos de origem microbiana que exibem atividade superficial consistem em subprodutos de seus respectivos sistemas metabólicos. Biosurfactantes são também moléculas anfifílicas que atuam na interface das emulsões e em termos de tensão superficial, estabilidade à temperatura e pH e são comparáveis aos surfactantes sintéticos. O presente trabalho objetivou mostrar a importância da fonte de nitrogênio para obter-se boa produção de biosurfactantes dentro de um processo eficiente. Para tal fim, avaliou-se a influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção de biosurfactantes por linhagens de *Bacillus sp.* cultivadas em suco de caju clarificado suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como fonte de nitrogênio. Avaliou-se as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L^{-1} de fonte de nitrogênio respectivamente. Observou-se uma produção de surfactina com valores aproximados, de $\approx 49,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $\approx 46,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $\approx 47,0 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente para as concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ estudadas. Observou-se ainda valores de tensão superficial em torno de $29 \pm 0,0 \text{ dina.cm}^{-1}$ bem como concentração de biomassa de $\approx 1,8 \text{ g.L}^{-1}$.

1. INTRODUÇÃO

Biosurfactantes são produzidos por biotransformação de matérias-primas renováveis, apresentando a vantagem de baixos impactos ambientais em relação aos detergentes químicos convencionais (Banat *et al.*, 2000).

Biosurfactantes são biomoléculas de superfície activa que são produzidos por uma variedade de microrganismos (Penfold *et al.*, 2012). Surfactantes quimicamente sintetizados são classificados de acordo com seu padrão de dissociação em água, ao contrário destes, os biosurfactantes são classificados por sua composição química, peso molecular, propriedades físico-químicas e modo de ação e de origem microbiana (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).



Segundo Pacwa-Płociniczak *et al.* (2011), uma característica de biossurfactantes é um balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), que especifica a porção dos componentes de hidrofílicos e hidrofóbicos em substâncias tensoativas.

Os surfactantes têm a capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais e de promover a formação de microemulsões, onde água pode solubilizar hidrocarbonetos (Fernandes *et al.*, 2008) além de encontrarem papel fundamental na estabilidade de emulsões, ou seja, a redução da tensão interfacial associada com a formação de uma emulsão (Shahidzadeh *et al.*, 2000), de tal forma que os surfactantes agem para facilitar a emulsificação através da formação de um filme adsorvido em torno das gotas dispersas, o que impede a floculação e a coalescência (Lima, 2004).

Vários estudos foram realizados para definir a melhor relação entre o carbono, nitrogênio, fósforo e ferro necessária para a obtenção de alta produção e bons rendimentos (Abouseoud *et al.*, 2008). Diversos biossurfactantes são conhecidos e seu tipo, quantidade e qualidade são influenciadas pelo microrganismo produtor, pela natureza do substrato disponível, pela concentração de íons com nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio e pelas demais condições de cultura, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (Banat, 1995).

Tendo em vista que o suco de caju é um potencial substrato a ser estudado, uma vez que é uma matéria-prima rica em carboidratos, fibras, vitaminas e sais minerais de grande abundância na região Nordeste e oriundo de resíduos do caju da agroindústria do estado do Ceará, estudos utilizando suco de caju clarificado têm sido realizados (Rocha *et al.*, 2006). O presente trabalho objetivou avaliar a influência da concentração de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju como substrato, a fim de obter uma condição favorável à obtenção de bons rendimentos de surfactante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima: utilizou-se como meio de cultivo para produção de biossurfactantes, suco de caju clarificado, a partir de cajus (*Anacardium occidentale* L). A matéria-prima (pedúnculos de caju) foi previamente processada na Embrapa Agroindústria Tropical, seguindo algumas etapas da metodologia de Melo *et al.*, (2000).

Meios de cultura: A linhagem foi mantida em meio APGE, composto por ágar, peptona, glicose e extrato de levedura, descrito em Giro *et al.* (2009). Posteriormente, a linhagem foi repicada em placas contendo o meio de cultivo e ágar no intuito de diminuir a fase de adaptação do microrganismo (fase LAG). Os testes para produção de biossurfactantes foram realizados utilizando suco de caju clarificado (CAJC) como meio de cultivo, suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, variando-se a concentração em 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹, respectivamente. A concentração inicial de açúcares redutores totais (ART) foi em torno de 20,8, 21,0 e 22,9 g.L⁻¹ para os respectivos ensaios supracitados variando a concentração da fonte de nitrogênio. Como a concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) é obtida através de diluições, não é possível obter-se valores exatos para cada meio preparado, tendo assim uma pequena variação na concentração inicial de ART de um ensaio para outro.



Microrganismo: o microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis* LAMI005, uma cepa isolada de um tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do *Campus* do Pici da Universidade Federal do Ceará (ETE-PICI). A linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Inóculo: Transferiram-se três colônias de *B. subtilis* LAMI005 para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (CAJC) com concentrações iniciais de ART em torno de 20 g.L^{-1} e suplementados com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio. Em seguida foram incubados em agitador rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brazil) a 180 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por ± 24 horas. Os meios de cultivo e o meio para inóculo foram ajustados previamente para pH 7,0 e esterilizados em autoclave a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min.

Ensaio para produção de biossurfactantes em shaker rotatório: Utilizou-se um agitador rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil). Os ensaios para produção de biossurfactantes foram conduzidos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm, durante 72 horas em duplicata, em erlenmeyers de 250 mL, contendo o meio de cultivo com adição de 10% v/v de inóculo em fase exponencial de crescimento, previamente ajustado, através de diluição com o meio de cultivo utilizado, para uma densidade óptica entre 0,1 – 0,2 a 600 nm. O volume total de meio de cultivo foi de 50 mL. Foram retiradas amostras nos tempos de zero, 03, 06, 08, 20, 24, 30, 48, 54 e 72 horas para posteriores análises.

Extração de surfactina: Foi realizada seguindo a metodologia de Nitschke e Pastore (2006), com pequenas modificações. Separaram-se as células do meio por centrifugação a 10.000 g por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e não foi feita clarificação. O sobrenadante foi ajustado para pH 2,0 com HCl 3M, para posterior extração líquido-líquido utilizando cloreto de metileno conforme descrito em Oliveira (2010).

Determinação da concentração de biomassa: determinou-se o crescimento celular pelo método indireto por turbidimetria, descrito em Giro *et al.* (2009).

Tensão superficial: determinou-se a tensão superficial do caldo fermentado livre de células, utilizando um Tensiômetro (Krüss K6) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, de acordo com o método do anel de Du Nöuy (Costa *et al.*, 2006).

Determinação da concentração de surfactina: Foi determinada em HPLC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Oliveira (2010).

Determinação da concentração de substrato: determinou-se a concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), descrito em Oliveira (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliou-se no presente estudo a influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactantes pela linhagem de *Bacillus subtilis* LAMI005, cultivado em suco de caju clarificado como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. As concentrações estudadas para a fonte de nitrogênio citada foram de 0,5, 1,0 e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. A Figura 1 apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para os ensaios realizados variando a concentração de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Pode-se observar na Figura 1 (A, B e C) que embora o microrganismo consuma tanto glicose como frutose, apresentou visível preferência por glicose, fato observado por Oliveira *et al.* (2011) em uma das condições estudadas quando avaliou diferentes meios de cultivo para



produção de biossurfactantes bem como por Giro *et al.* (2009). Observa-se ainda que não houve completo consumo de substrato, o que pode ser justificado devido o suco de caju clarificado ser um substrato rico em vitaminas e minerais, e assim o microrganismo consome os demais nutrientes concomitantemente aos substratos presentes no suco. O ensaio com concentração inicial de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi o que apresentou maior concentração de biomassa, em torno de $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ enquanto os e com concentração de $0,5$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de fonte de nitrogênio apresentaram valores de biomassa de $\pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$. Todos os ensaios realizados, utilizando concentrações de $0,5$ e $1,0$ e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram resultados semelhantes para formação de produto, a surfactina, com concentrações de $49,0$, $46,0$ e $47,0 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente para os ensaios citados.

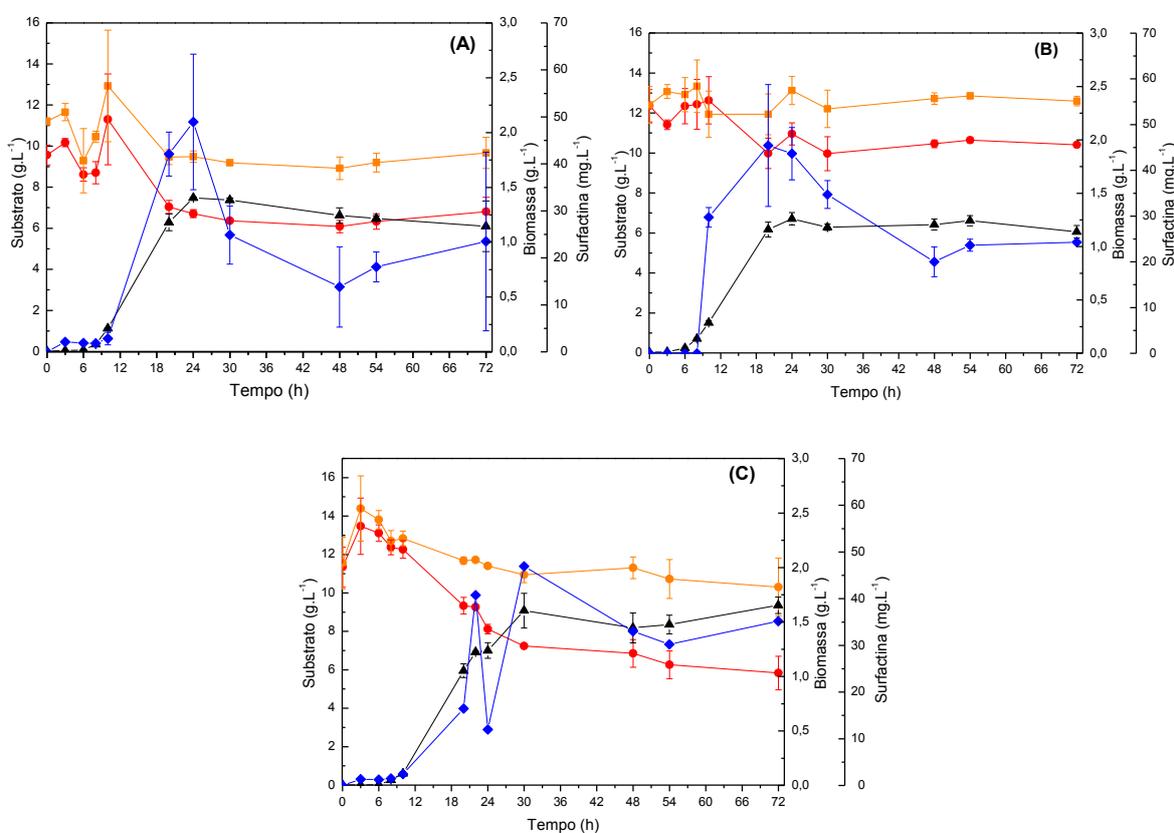


Figura 1 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) e variação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (A) $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (B) $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (C) $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentrações iniciais de ART: $20,8 \text{ g.L}^{-1}$ (A), $21,0 \text{ g.L}^{-1}$ (B); $22,9 \text{ g.L}^{-1}$ (C). (▲) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (■) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

Segundo Banat (1995), a fonte de nitrogênio é um dos fatores que exercem grande influência na produção de biossurfactantes. Sabe-se que a produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, e neste caso pode ser citado o uso de baixas concentrações da fonte de nitrogênio (Desai e Banat, 1997). Tal afirmação pode justificar os resultados



obtidos, pois como as concentrações de produto obtidas foram muito próximas, acredita-se que a ação exercida pela fonte de nitrogênio foi similar em todas as condições estudadas. Para obtenção de quantidades significativas de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo (*Fontes et al.*, 2008).

Pode-se observar através dos resultados obtidos que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 é um metabólito primário, pois o consumo de substrato e a formação de produto estão associados ao crescimento celular. Segundo Schmidell *et al.* (2001), tal configuração representa o caso em que o produto formado, o metabólito primário, está diretamente ligado às reações de catabolismo ou decomposição de substrato, neste caso, os açúcares. Kim *et al.* (1997) ao estudarem a produção e propriedades do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* C9 observaram que a produção de biossurfactante foi associada ao crescimento. Os autores verificaram ainda, uma relação quase paralela entre a produção de biossurfactantes, crescimento celular e utilização de glicose. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, podendo ser observado na Figura 1 (A, B e C).

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos de tensão superficial para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

Pode-se observar pela Tabela 1 que houve boa redução da tensão superficial em todos os ensaios, pois estudos mostram que valores de tensão superficial abaixo de 35 dina.cm⁻¹, indicam a presença de biossurfactante (Mulligan *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Resultados obtidos de tensão superficial para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

Tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	0,5 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄
	Tensão Superficial (TS)	Tensão Superficial (TS)	Tensão Superficial (TS)
	dina/cm	dina/cm	dina/cm
MC	52,12 ± 0,2	56,07 ± 0,1	53,00 ± 0,1
0h	50,00 ± 0,0	55,12 ± 0,2	52,08 ± 0,1
3h	49,03 ± 0,1	50,08 ± 0,2	50,03 ± 0,1
6h	49,03 ± 0,1	50,10 ± 0,1	38,03 ± 0,1
8h	47,12 ± 0,2	35,00 ± 0,0	38,03 ± 0,1
10h	34,90 ± 0,1	30,00 ± 0,0	36,00 ± 0,0
20h	31,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0
24h	31,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0	30,03 ± 0,0
30h	31,03 ± 0,1	30,25 ± 0,3	30,00 ± 0,0
48h	31,00 ± 0,0	29,80 ± 0,3	30,00 ± 0,0
54h	31,00 ± 0,0	29,25 ± 0,3	30,00 ± 0,0
72h	31,10 ± 0,1	29,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

Para que aconteçam significativas reduções de tensão superficial necessita-se apenas da quantidade mínima de surfactante no meio, atingindo-se assim a concentração micelar crítica



(CMC). Quando há o aumento da concentração de surfactante no meio, a tensão superficial diminui, ocorrendo a formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (Mulligan, 2005; Piróllo, 2006; Rufino, 2006).

A Figura 2 mostra a conversão de substrato para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

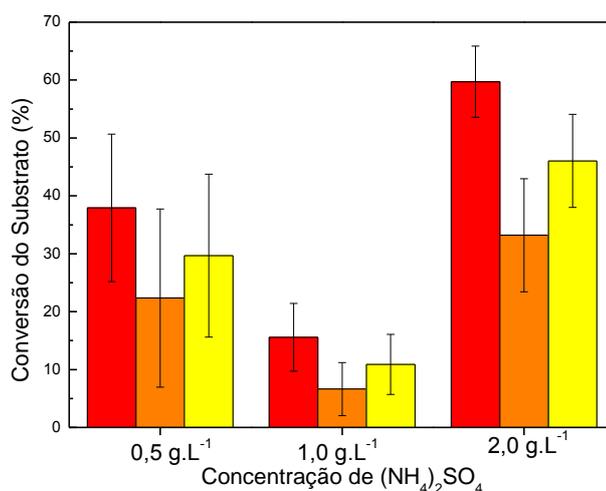


Figura 2 – Perfil apresentado para conversão de substrato para ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio de 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹ e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. (■) Glucose; (■) Frutose; (■) Açúcares Redutores Totais (ART).

De acordo com a Figura 2, verifica-se que o ensaio em que houve maior conversão de substrato foi com concentração de 0,5 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, resultado este, condizente com a produção de surfactina e crescimento celular.

Durante os ensaios fermentativos para produção de biossurfactantes, onde foram feitas medidas de pH, observou-se tendência para acidez, obtendo-se valores de até 4,0 em todas as condições estudadas. A acidificação indica que está havendo produção de biossurfactante, no entanto, sabe-se que surfactantes precipitam em pH ácido (Barros *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2004). Observou-se então a necessidade de ajustar o pH das amostras para 7,0, pH básico, antes da remoção das células, a fim de evitar possíveis perdas do produto na centrifugação e conseqüentemente falhas nas análises a serem realizadas.

Realizaram-se ainda testes de emulsificação, onde o surfactante produzido apresentou boa capacidade emulsificante utilizando n-hexadecano, querosene e óleo de soja como fontes hidrofóbicas observando-se comportamentos distintos para cada condição estudada. A literatura mostra que resultados em torno de 50% são considerados satisfatórios (Barros *et al.*, 2008; Piróllo, 2006).

A capacidade emulsificante vai depender da qualidade do surfactante produzido, bem como da quantidade disponível no líquido metabólico utilizado para os testes. Existem ainda



outros produtos oriundos do processo fermentativo presentes no meio, pois sabe-se que o microrganismo é capaz de liberar mais de um produto de interesse e estes podem interferir na ação emulsificante.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para o teste de índice de emulsificação para todas as condições estudadas de variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tabela 2 - Resultados obtidos de índice de emulsificação (IE_{24}) para os ensaios realizados para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 variando a concentração da fonte de nitrogênio.

Índice de Emulsificação (%)			
Ensaio A			
Amostra	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	4,31 ± 0,01	47,41 ± 0,01	41,67 ± 0,35
48 h	14,46 ± 0,03	66,29 ± 0,02	41,15 ± 0,50
54 h	33,54 ± 0,30	56,41 ± 0,16	68,13 ± 0,12
72 h	33,80 ± 0,30	64,31 ± 0,06	67,24 ± 0,00
Ensaio B			
Amostra	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	NF	60,70 ± 0,07	NF
48 h	NF	NF	4,5 ± 0,01
54 h	NF	NF	16,44 ± 0,23
72 h	NF	4,13 ± 0,06	18,00 ± 0,25
Ensaio C			
Amostra	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	51 ± 0,04	3,52 ± 0,00	7,36 ± 0,00
48 h	43,48 ± 0,01	5,87 ± 0,03	7,36 ± 0,00
54 h	39,77 ± 0,05	7,44 ± 0,00	12,05 ± 0,01
72 h	48,36 ± 0,05	8,03 ± 0,00	6,14 ± 0,03

NF: Não formou emulsão
Ensaio A (0,5 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); Ensaio B (1,0 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e Ensaio C (2,0 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

4. CONCLUSÕES

O biossurfactante produzido no meio de cultivo contendo suco de caju clarificado como fonte de carbono variando a concentração da fonte de nitrogênio de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para até 29,0 ± 0,0 dina/cm. A maior concentração de biossurfactante obtida foi no ensaio com concentração de 0,5 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtendo-se valores em torno de 49,0 mg.L⁻¹. Diante dos resultados conclui-se que a concentração da fonte de nitrogênio é um importante parâmetro a ser estudado para produção de biossurfactantes, no intuito de se obter boa produtividade associada a bons rendimentos, no entanto, mais estudos são necessários para que se obtenha resultados significativos.



5. REFERÊNCIAS

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v. 223, p. 143–151, 2008.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, *Bioresource Technol.*, v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p. 495-508, 2000.
- 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.*, Campinas, ed. 28, v. 4, p. 979-985, 2008.
- 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. *Process Biochem.*, v. 41, p. 483 – 488, 2006.
- DESAI, J.D.; BANAT I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol.*, v. 61 (1), p.47, 1997.
- FERNANDES, A. C. L. B.; PEREIRA, M. D. ; KRONEMBERGER, F. A.; FREIRE, D. M. G. Produção de biosurfactantes para aplicação em remediação de solos contaminados por Petróleo: estudo dos fatores de virulência. In: *RIO OIL & GAS Expo and Conference*, Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, 2008.
- FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biosurfactante por leveduras. *Quím. Nova*, v. 31(8), p. 2091-2099, 2008.
- 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.
- 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. *J. of Ferment. Bioengineer.*, v. 84, n. 1, p. p. 41-46, 1997.
- LIMA, R. K. C. Estudos de Composição e Estabilidade de Emulsões Preparadas a Base de Óleo Mineral Naftênico. *Dissertação de Mestrado* (Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 2004.
- MELO, C.S.; MAYORGA, R.D.; MAYORGA, I. O.; PAULA PESSOA, P.F.A. *Subsídios à gestão empresarial na busca de competitividade: o caso do mel clarificado de caju*. Revista Econômica do Nordeste, Fortaleza, v. 31, n. 4, p.1050-1058, 2000.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollution*, v.133, p. 183-198, 2005.



- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technol.*, v. 97, p. 336-341, 2006.
- OLIVEIRA, D. W. F. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, Brasil, 104 f., 2010.
- OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FELIX, A. K. N.; APOLÔNIO, J. M. A.; BEZERRA, D. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. G. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005: Avaliação do Meio de Cultivo. *XVIII Simp. Nac. de Bioproc.* (SINAFERM 2011), Caxias do Sul – RS, 2011.
- PENFOLD, J.; THOMASB, R. K.; SHENC, H-H. Adsorption and self-assembly of biosurfactants studied by neutron reflectivity and small angle neutron scattering: glycolipids, lipopeptides and proteins. *Soft Matter*, v. 8, p. 578–591, 2012.
- PIRÔLLO, M.P.S. *Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro – São Paulo, 2006.
- PACWA-PLÓCINICZAK, 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.
- 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*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 1295-1299, 2006.
- RUFINO, R. D. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. *Dissertação de Mestrado* (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco, 95f., 2006.
- SHAHIDZADEH, N.; BONN, D.; MEUNIER, J.; NABAVI, M.; AIRIAU, M.; MORYAN, M. Dynamics of Spontaneous Emulsification for Fabrication of Oil in Water Emulsions. *Langmuir*. 16, p. 9703-9708, 2000.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnol. Ind. – Eng. Bioq.*, São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, p. 179-192, 2001.
- WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.*, v. 20, p. 979-983, 2004.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Agência Nacional do Petróleo (ANP) – Programa de Recursos Humanos (prh), à Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) e ao Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Biotecnológicos (GPBio).

AValiação DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus subtilis*

D. P. BEZERRA¹, D. W. F. de OLIVEIRA², I. W. L. de FRANÇA², J. A. M. APOLÔNIO²,
V. M. M. MELO³ e L. R. B. GONÇALVES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal do Rio de Ceará, Departamento de Engenharia Química

³ Universidade Federal Ceará, Departamento de Biologia

E-mail para contato: dianabezerra@yahoo.com.br

RESUMO – A surfactina, metabólito primário do microrganismo *Bacillus subtilis*, foi produzida utilizando como fonte de carbono um resíduo agroindustrial, o suco de caju clarificado com concentração inicial de $\approx 20,00$ g/L de açúcares redutores totais (ART), e como fonte de nitrogênio o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentração de 1,0 g/L. O presente estudo faz uma avaliação da influência da temperatura na produção de biosurfactantes (28°C , 30°C , 32°C e 34°C), buscando uma possível identificação da temperatura ótima de produção da surfactina. Avaliou-se, em todos os ensaios realizados, a concentração de biomassa, formação de produto, consumo de substrato, tensão superficial do meio livre de células e índice de emulsificação. Obteve-se maior concentração de biomassa na temperatura mais elevada, 30°C , com concentração celular de $\approx 4,1$ g/L, no entanto, esta condição não foi a que propiciou a maior produção de surfactina. A maior concentração do produto foi obtida na temperatura de 32°C , obtendo-se concentrações de aproximadamente 60 mg/L. Obteve-se menor valor de tensão superficial também na temperatura de 32°C , apresentando resultado de $\approx 29,0$ dina.cm⁻¹. Logo, observa-se a relevância dessa pesquisa em analisar a influência da temperatura para a produção de biosurfactantes como fator determinante para uma boa produção de surfactina, metabólito produzido pelo microrganismo *Bacillus subtilis*.

1. INTRODUÇÃO

Os biosurfactantes são compostos formados por moléculas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas que através de seu acúmulo nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, reduzem a tensão superficial e interfacial aumentando a área superficial dos compostos insolúveis. São compostos com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Banat *et al.*, 2000).

Entre os gêneros *Bacillus sp.*, *B. subtilis* produz um amplo espectro de lipopeptídeos bioativos que têm um grande potencial para aplicações biotecnológicas e biofarmacêuticas. O microrganismo estudado, *Bacillus subtilis*, é capaz de produzir surfactantes em substratos hidrossolúveis (Cooper, 1981), logo, se adapta bem ao substrato em estudo, suco de caju clarificado.

Diversos fatores podem influenciar diretamente na estrutura e atividade dos biossurfactantes dentre os quais podem ser citados a fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura, pH, salinidade, entre outros (Fernandes, 2007). A temperatura é um fator determinante nas velocidades das reações químicas e propriedades das biomoléculas, sendo assim, um parâmetro de estudo para delimitar uma faixa para o crescimento dos microrganismos. Esse parâmetro é relacionado à capacidade de sintetizar constituintes celulares com uma estabilidade maior ou menor ao calor (Esmeraldo, 2010).

O presente estudo visa avaliar a influência da temperatura na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, utilizando suco de caju clarificado como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

2. Material e Métodos

Para manutenção e repique das culturas de *Bacillus subtilis* LAMI005, utilizou-se o meio APGE, contendo: peptona 5,0 g/L, glicose 5,0 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L e ágar 15,0 g.L⁻¹.

Para a produção do inóculo três alçadas da cultura foram transferidas da placa de petri para frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de propagação do inóculo, composto por suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0$ g/L de açúcares redutores totais (ART) como fonte de carbono e 1,0 g/L de (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio. Foi adicionado ao meio de cultivo uma proporção de 10% v/v de inóculo. Posteriormente, os frascos foram incubados em agitador rotatório (*Shaker* Tecnal TE-480) a 180 rpm, utilizando as temperaturas de 28°C, 30°C, 32°C e 34°C por em média 24 horas para inóculo e 72 horas para cultivo.

As amostras retiradas foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 g, 4°C e o sobrenadante livre de células, submetido às análises. As medidas de tensão superficial foram realizadas em tensiômetro Kruss pelo método de Du Nöuy (Costa *et al.*, 2006). O índice de emulsificação foi determinado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987) e Makkar e Cameotra (1997). A concentração de surfactina produzida e o consumo de substrato foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito em Oliveira, 2010.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1, apresenta os resultados de concentração de biomassa, produção de surfactina, consumo de ART (Açúcares Redutores Totais), e a redução do pH em função do tempo para os ensaios com variação da temperatura de 28°C, 30°C, 32°C e 34°C.

Pode-se observar que os ensaios de maior temperatura (32°C e 34°C) apresentaram uma fase lag reduzida quando comparada as fermentações submetidas a temperaturas inferiores. Nas temperaturas mais altas também foi observado maior consumo de substrato. Como pode ser observado na Figura 1 (C). Houve redução do pH em todas os ensaios realizados, atingindo-se valores de $\pm 4,0$ conforme mostra a Figura 1(B).

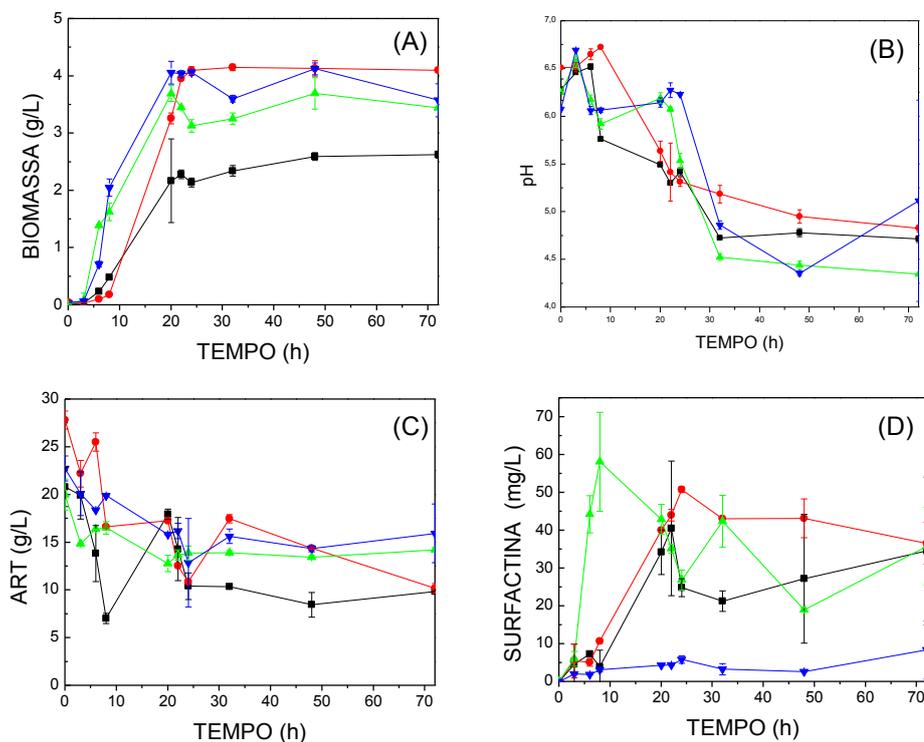


Figura 1 – Perfil da concentração de biomassa (A), pH (B), consumo de substrato (C) e produção de surfactina (D) em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005, utilizando suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de ≈ 20 g/L + sulfato de amônio (1,0 g/L). Processo fermentativo submetido às temperaturas de (■) 28°C, (●) 30°C, (▲) 32°C, (▼) 34°C.

Houve maior produção de surfactina no ensaio sob temperatura de 32°C, chegando a concentração de $\pm 58,10$ mg/L, apresentado o maior potencial de produção entre as temperaturas estudadas. Para 30°C a formação do produto chegou a concentração de 50,74 mg/L. Quanto aos processos realizados a 28°C e 32°, a produção de surfactina foi representativa, chegando a concentração de $40,48 \pm 17,78$ mg/L e $8,35 \pm 7,64$ mg/L respectivamente.

A redução da tensão superficial é um indício de que há surfactante no meio fermentado, pois a redução da tensão superficial do meio está relacionada à sua presença bem como à qualidade do surfactante obtido (Bueno, 2010). Observou-se uma maior redução no ensaio com temperatura de 32°C chegando a $29,1 \pm 0,01$ dina/cm, porém o ensaio realizado a 30°C apresentou tensão superficial estável.

Para os ensaios realizados variando a temperatura observou-se a redução da tensão superficial de $59,92 \pm 0,74$ para $32,12 \pm 0,21$ dina/cm a 28°C, de $57,37 \pm 1,18$ para $29,45 \pm 0,5$ dina/cm a 30°C, de $48,15 \pm 0,05$ para $31 \pm 0,00$ dina/cm a 32°C, e de $61,63 \pm 0,52$ para $30 \pm 1,41$ dina/cm a 34°C, mostrando a eficiência do tensoativo produzido.

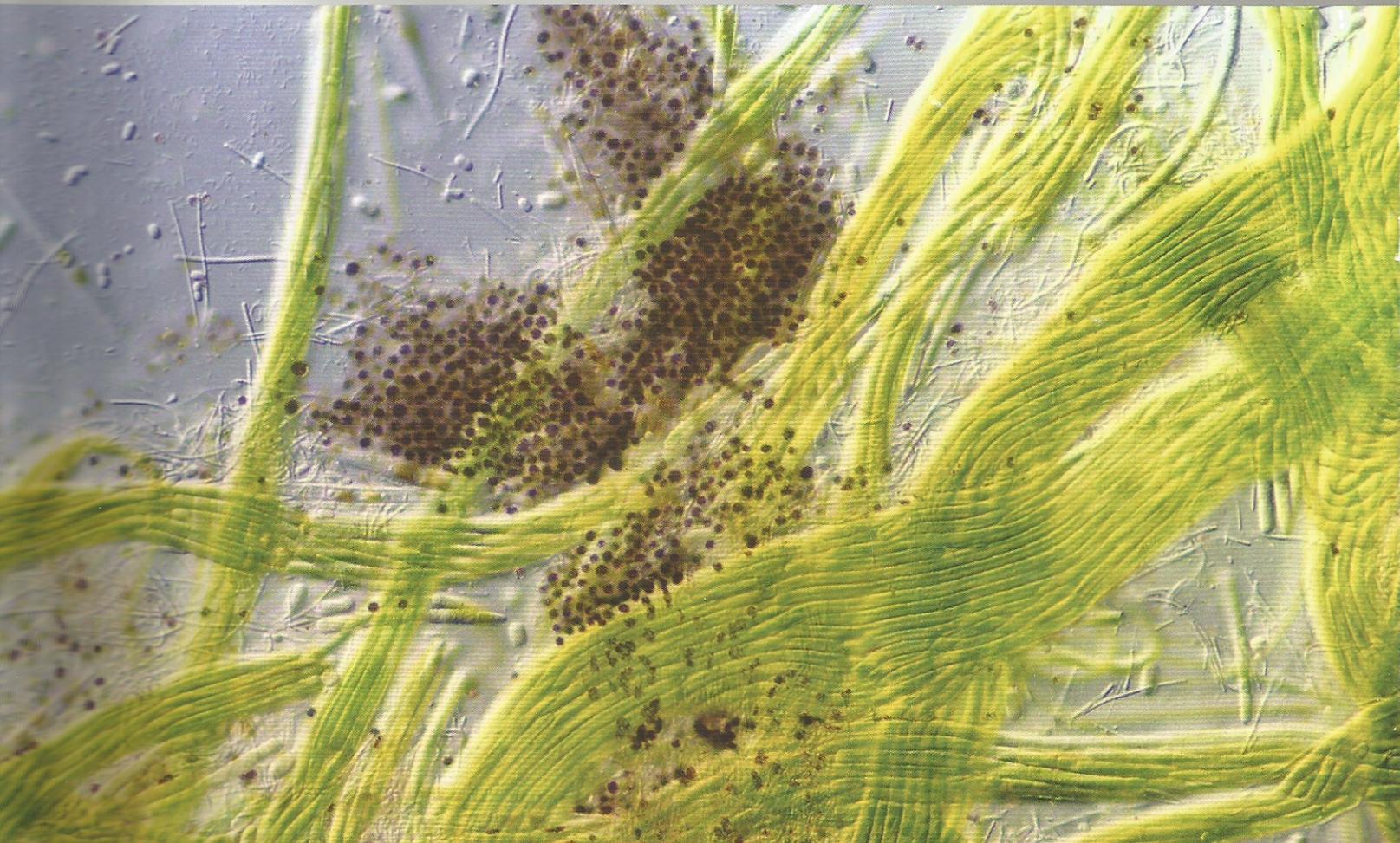
4. CONCLUSÃO

A relação entre os ensaios realizados mostrou ser viável a produção de surfactina por *B. subtilis* utilizando a temperatura de 32°C, condição onde se obteve a maior concentração do produto, com rendimentos em torno de 60 mg.L⁻¹. Observou-se ainda elevado crescimento celular, com concentrações de $\pm 4,0$ g.L⁻¹ e relevante redução da tensão superficial, com reduções para até $\pm 29,0$ dina.cm⁻¹. Logo, é notável a influência da temperatura no presente estudo no intuito de otimizar-se os processos de produção de biossurfactantes objetivando a elevação dos rendimentos obtidos.

5. REFERÊNCIAS

- BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S., Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, v.53, p. 495-508, 2000.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H., estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 7, 1572-1577, 2010.
- COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N., Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 408, 1981.
- ESMERALDO, F. S., Influência da Temperatura na Produção de Surfactina por *Bacillus Subtilis* LAMI005. *Monografia* (Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2010.
- FERNANDES, P. L. Produção de biossurfactantes por *Bacillus spp.* em condição anaeróbia. *Dissertação de Mestrado* (Microbiologia Agrícola) - Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- OLIVEIRA, D. W. F., Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2010.

A special conference of the
Society for Industrial Microbiology and Biotechnology



35TH SBFC

Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals

April 29 - May 2, 2013
Hilton Portland Hotel
Portland, OR



Poster 2-24**Valorization of chestnut shells for hydrogen production by *Clostridium butyricum* fermentation**

P. Moura¹, A. Morana², S.M. Paixao¹, L. Alves¹, L. Maurelli², E. Ionata² and F. La Cara²

(1)LNEG, Lisbon, Portugal

(2)National Research Council of Italy, Naples, Italy

f.lacara@ibp.cnr.it

Chestnut shells (CS) is an agronomic waste generated from the peeling process of the chestnut fruit. It is well-known that the extract of CS contains high amounts of tannins, which are polyphenolic antioxidants, but this agronomic residue also contains about 36% sugars in form of polysaccharides, and no utilization of chestnut shells as potential source of fermentable sugars has been considered so far. As consequence, this waste represents an interesting exploitable source for monosaccharides production, and in this study we evaluated the potential of biohydrogen production from CS hydrolyzate.

CS (5% w/v) were soaked in ammonium hydroxide (10% v/v) at 70°C for 22h to remove lignin, and then subjected to saccharification of the cellulose and xylan fractions for 72h at 50°C, pH 5.0 by enzymatic cocktail prepared with commercial enzymes. The resulting CS hydrolyzate was detoxified with activated charcoal, and used as carbon and energy source in fermentations by *C. butyricum*. After 72 hours 83.6% of the initial glucose and xylose were consumed, yielding 1.92 mol·mol⁻¹ of H₂. The ratio of H₂/CO₂ in the biogas produced was 1.3, and the hydrogen volumetric production rate attained 449 ml·l⁻¹·day⁻¹. These results demonstrate the adequacy of CS for the biological production of hydrogen.

The strategy proposed in this work for CS upgrading holds a promise for future optimization of the physical-chemical/enzymatic treatments and detoxification process and bioconversion yield.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support of the Project FCT-CNR – Italia 128585955528141.

Poster 2-25**Microaerobic conversion of glycerol to ethanol by *Escherichia coli***

M.S. Wong^{*}, M. Li, R.W. Black, T.Q. Le, S.S. Puthli, P. Campbell and D.J.

Monticello

Glycos Biotechnologies, Inc, Houston, TX

mwong@glycosbio.com

Glycerol has become a desirable feedstock for the production of fuels and chemicals due to its availability and low price. We have developed a strain and process for the efficient microaerobic conversion of glycerol to ethanol by *Escherichia coli* using only *E. coli* genes. To increase yield, we eliminated glycerol-utilizing pathways that produce byproducts such as acetate, succinate, and lactate. To increase the rate, titer, and specific activity, we up-regulated glycerol uptake genes *dhaKLM*, *gldA*, and *glpK*, as well as the ethanol pathway gene *adhE*. The final strain is able to produce 46.5 g/L of ethanol in 45 hours with 87% of theoretical yield. The specific activity of the strain is 1.16 mmol/L/h/OD. This represents the best reported productivity for the production of ethanol from crude glycerol, a sustainable, renewable, non-food alternative to sugar-based ethanol fermentations.

Poster 2-26**Biosurfactantes production by bacterial strains isolated from mangroves of Ceará - Brazil**

D.W. Oliveira¹, W. França Sr.¹, D.P. Bezerra², V.M.M. Melo¹ and L.R.B. Gonçalves¹

(1)Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

(2)Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

italowaldimiro@gmail.com

Biosurfactants of microbial origin are compounds which exhibit surfactant properties, and consist of metabolic by-products of bacteria, fungi and yeasts. Such products can be used in various applications such as bioremediation of hydrocarbons, in agriculture, food industry, pharmaceutical, cosmetics and others. They have ecological, economic and social benefits, since they are biodegradable and non-toxic to the environment. Furthermore, they have the ability to remain stable under extreme conditions of pH, temperature and salinity. In the present study, strains of microorganisms that were previously identified as being gene positive for surfactin production were investigated. These strains were isolated from mangroves of Ceará – Brazil and named ICA 24 and ICA 56. Growth and surface tension reduction was observed for both microorganisms investigated. The surface tension of the fermented broth free of cells was reduced to 29.25 ± 0.4 dyne/cm (ICA 24) and 29.75 ± 1.1 24 dyne/cm (ICA 56). It is known that a criterion for selecting biosurfactant producing microorganisms is their ability to reduce surface tension. Surfactin, for instance, a well-known biosurfactant, can decrease the surface tension of water from 72 dina/cm to 27.9 dyne/cm when present at the concentration of 0.005%. These results indicate that ICA 24 and ICA 56 are promising strains for biosurfactant production.

Poster 2-27**Evaluation of the potential of biosurfactant production by *Bacillus* strains in different culture media**

D.W. Oliveira¹, W. França Sr.¹, D.P. Bezerra², V.M.M. Melo¹ and L.R.B. Gonçalves¹

(1)Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

(2)Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

italowaldimiro@gmail.com

In this study, the potential in producing biosurfactant by *Bacillus subtilis* Jag 248, a strain that was selected from the collection of bacteria belonging to the Laboratory of Microbiology and Immunology, Federal University of Ceará, was evaluated. Three different culture media were studied: clarified cashew apple juice, mineral medium and mineral medium supplemented with a solution of micronutrients. When *Bacillus subtilis* Jag 248 was grown in clarified cashew apple juice, surfactin and biomass concentrations of around 27.0 mg·L⁻¹ and 1.0 g·L⁻¹ were achieved, respectively. On the other hand, when mineral medium was used, surfactin and biomass concentration was 161.0 mg·L⁻¹ and 1.5 g·L⁻¹, respectively. Furthermore, the supplementation of mineral medium with a solution of micronutrients did not enhance biomass concentration, that was around 1.3 g·L⁻¹. Regarding substrate consumption, a significant amount of residual carbon was observed when *B. subtilis* Jag 248 was cultivated in clarified cashew apple juice. On the contrary, the strain consumed the carbon source present in mineral medium after 20 hours of culture. The surface tension of all media was reduced to 29.0 dyna·cm⁻¹, which indicates biosurfactant production. The pH of all media studied was between 6.0 and 7.0. These results show that the strain evaluated in this work is a potential biosurfactant producer and further experiments will be performed in order to optimize production.

Production of a biosurfactant from *Bacillus* sp. and its application to the remediation of a motor-oil-contaminated sand

Freitas de Oliveira, Darlane W.¹, Moya Ramirez, Ignacio^{2*}, Maciel Melo, Vânia M.³, Jurado Alameda, Encarnación², Rocha Barros Gonçalves, Luciana¹, Altmajer Vaz, Deisi²

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Bloco 709, Campus do Pici, CEP. 60.455-760, Fortaleza, CE, Brazil - e-mail : lrg@ufc.br

²University of Granada, Chemical Engineering Department, Faculty of Sciences, Avenida Fuentenueva s.n., 18071, Granada, Spain

³Universidade Federal do Ceará, Depto. de Biologia, LemBiotech, Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Bloco 909, Campus do Pici, CEP. 60.455-760, Fortaleza, CE, Brazil

* ignaciomr@ugr.es

Biosurfactants are biological surface active agents produced by microorganisms, plants and animals [1]. Compared to conventional synthetic surfactants, biosurfactants exhibit great variability in their hydrophobic and hydrophilic moieties, as well as a generally lower environmental impact [2, 3]. Lipopeptides produced by bacteria of the *Bacillus* genus [4], are among the most effective biosurfactants. In the present work we have studied the production of a microbial surfactant from *Bacillus* sp., and its application to wash soils contaminated by lubricant oil. Soil washing experiments were also conducted with saponin from Quillaja Bark. The amount of motor oil removed from the soil increased with surfactant concentration and temperature. The maximum percentage of oil removed was 85%, approximately, for both saponin and *Bacillus* sp. surfactant; however, a higher concentration of saponin (2.4 g/L vs. 60 mg/L of the microbial surfactant) was needed to reach this maximum. In addition, the stability of O/W emulsions formulated with dodecane and both surfactants was studied by monitoring the back-scattered light intensity at the bottom of a cuvette containing an emulsion sample. Emulsions formulated with both surfactants underwent a fast destabilization by creaming, with a decrease of scattering intensity of 90% within two hours. Only the emulsions prepared with saponin concentrations three-fold higher than its CMC remained stable for a longer period.

Acknowledgements: Authors acknowledge the financial support of the Brazilian and Spanish Governments through project PHB2012-0277-PC, and of the Andalusian Regional Government through project P10-TEP-6550. D.W.F.O. also acknowledges the CAPES and CNPq (Brazil) for the award of a scholarship.

- [1] Al-Wahaibim Y.; Joshi, S.; Al-Bahry, S.; Elshafie, A.; Al-Bemani, Ali; Shibulal, B., *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, 114, 324-333.
- [2] Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S., *Applied Microbiology Biotechnology* **2000**, 53, 495-508.
- [3] Desai, J. D.; Banat, I. M., *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1997**, 61, 47-64.
- [4] Banat, I.M. et al., *Applied Microbiology Biotechnology* **2010**, 87, 427-444.

BIODEGRADABILITY OF A BIOSURFACTANT PRODUCED BY A MICROORGANISM ISOLATED FROM THE SOIL OF A MANGROVE (CEARÁ, BRAZIL)

Darlane Wellen Freitas de Oliveira^{1*}, Alejandro Burgos Cara², Manuela Lechuga Villena², Vânia Maria Maciel Melo³, Luciana Rocha Barros Gonçalves¹, Deisi Altmajer Vaz²

¹ Chemical Engineering Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

² Chemical Engineering Department, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain

³ Department of Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

*DEQ/Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, Bl. 709; CEP:60455-760, Fortaleza, CE, BRASIL; e-mail contact: darlannefreitas@gmail.com

Biosurfactants are surface active compounds produced by microorganisms. Currently they are receiving great interest due to the advantages they present when compared to chemical surfactants, such as improved interfacial properties, and functionality under extreme conditions of pH, temperature, among others. However, the environmental properties of biosurfactants have been scarcely studied. In this work, we have studied the biodegradability of a biosurfactant produced by a strain of *Bacillus subtilis* called ICA 56, which was isolated from the soil of a mangrove located at Ceará State (Brazil). Biodegradation tests according to the standard UNE 55-844-91, were conducted for 28 days. The experimental procedure consisted in inoculating a small amount of aerobic microorganisms, coming from a mixed and aerated population into a nutritional aqueous medium suitable for microbial growth. This test is routinely used to determine the biodegradability of anionic and non ionic surfactants. The inoculum was obtained from an urban sewage station named "UTE EDAR GRANADA SUR" (Granada - Spain). Biodegradability of the biosurfactant was evaluated analyzing the consumption of dissolved organic carbon in a Total Organic Carbon Analyzer, (TOC-VCSH - Shimadzu) throughout the assay. Biosurfactant concentrations tested were 0, 10, 25, 50, 100 and 200 mg/L. Results showed that, for all biosurfactants concentrations tested, there was a 50% reduction of the dissolved organic carbon after 100 hours of experiment. For the highest concentration tested (200 mg/L of biosurfactant), the amount of dissolved organic carbon was less than 10 mg/L at 336 hours (14 days). These results indicate that the biosurfactant is highly biodegradable. Additionally, as the critical micelle concentration (CMC) of the biosurfactant under study is approximately 20.0 mg/L at 25°C, a concentration of 200 mg/L will seldom be used in practice.

Keywords: biosurfactants, biodegradability, *Bacillus subtilis*

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of the Brazilian and Spanish Governments through project PHB2012-0277-PC, and of the Andalusian Regional Government through project P10-TEP-6550. D.W.F.O. also acknowledges CNPq (Brazil) for the award of a scholarship. ("Programa Ciência sem Fronteiras").

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Bacillus subtilis* MTCC 2423 FROM OIL WASTES AND “ALPEORUJO”

Darlane Wellen Freitas de Oliveira^{1*}, Ignacio Moya Ramírez², Danielle Maass³, Miguel García-Román², Deisi Altmajer Vaz², Luciana Rocha Barros Gonçalves¹

¹. Chemical Engineering Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

². Chemical Engineering Department, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain

³. Chemical Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

*DEQ/Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, Bl. 709; CEP:60455-760, Fortaleza, CE, BRASIL; e-mail contact: darlannefreitas@gmail.com

Spain is the first olive oil producing country in the world and thus, the valorization of oil wastes residues play an important role on the economy and environmental areas. In this study we have investigated the use of the frying wastes oils (mixtures of olive and sunflower oils) and “alpeorujo” as carbon sources to produce surfactants by microorganisms. Biosurfactants are bioactive agents that can be produced by different microorganisms. Among those, special attention is given to strains of *Bacillus sp.*, since they can produce many types of biosurfactants in large scale, using several kinds of substrates. One reason for this production is economically viable, it is recommended to use sources of residual carbon. The fermentation process was performed by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 30 °C in a discontinuous mode (shake flasks with 250 mL of capacity). The kinetics of biosurfactant production was followed by measurements of surface tension (ST) of the culture media without cells over time. Figures 1(A) and 1(B) show the values of surface tension obtained in the testes performed with different carbon sources. For both waste oil and alpeorujo, surface tension archived a constant value after 48 hours of test (between 32,0 and 35,0 mN/m). Similar results were obtained with olive oil (Fig. 1(B)); no differences were observed on the surface tension values obtained with 20 g/L and 50 g/L of olive oil. The residual carbon sources tested have shown promise for the production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* MTCC 2423. Hence, considering the low values of surface tension obtained, both “alpeorujo” and waste frying oils can be used to product biosurfactants, however, more studies must be done.

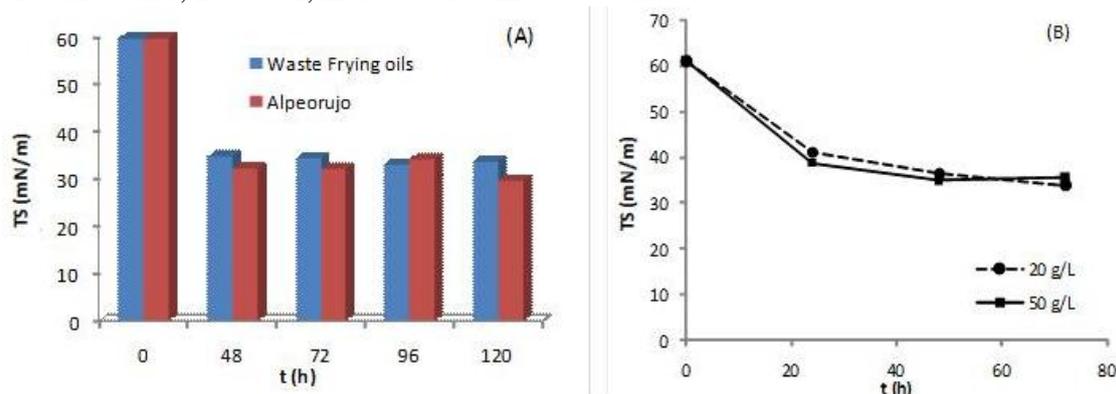


Figure 1: Surface tension values of culture media free of cells over time performed with waste frying oils and alpeorujo (A) and olive oil (B).

Keywords: Waste frying oil, “alpeorujo”, biosurfactant.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of the Brazilian and Spanish Governments through project PHB2012-0277-PC, and of the Andalusian Regional Government through project P10-TEP-6550. D.W.F.O. also acknowledges CNPq (Brazil) for the award of a scholarship. (“Programa Ciência sem Fronteiras”).