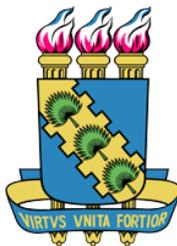


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

MARYLANE DE SOUSA

**BIOCONVERSÃO DO GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES:
APLICAÇÃO NO PREPARO DE EMULSÕES**

**FORTALEZA – CE
2011**



MARYLANE DE SOUSA

**BIOCONVERSÃO DO GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES:
APLICAÇÃO NO PREPARO DE EMULSÕES**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana e
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA – CE
2011

MARYLANE DE SOUSA

BIOCONVERSÃO DO GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE BIOCOSURFACTANTES:
APLICAÇÃO NO PREPARO DE EMULSÕES

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a Dra. Priscilla Filomena Fonseca Amaral
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

AGRADECIMENTOS

Pessoas fundamentais no meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, que acreditaram em mim e apoiaram-me. A ver:

Devoto inicialmente meu agradecimento todo especial a Deus, com interseção de Santo Expedito, que sou devota, agradeço pela vida, saúde, por ter me dado força, coragem por ter batalhado pelos meus ideais e pela oportunidade de alcançar mais uma vitória em minha vida.

Igualmente especial, agradeço a meus pais, base da minha existência, por terem me ensinado sempre a importância da formação, pelo incentivo, pelo apoio, pela participação ao longo desta caminhada. A minha irmã pela paciência, pela admiração, pelo companheirismo e crédito. Aos meus familiares em geral, que sempre torceram por mim. Forte abraço a todos.

A Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, meus sinceros agradecimentos, pela qual tenho profunda admiração e respeito, por sua paciência, compreensão e participação em todos os momentos do meu trabalho. Seria impossível expressar através de simples palavras a gratidão que sinto por sua dedicação e profissionalismo permanente.

Ao Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana por ter aceitado a orientação da minha dissertação e oferecido seu apoio, cuja excelência profissional conferiu prestígio e valor inestimáveis a este trabalho de mestrado, agradeço por ter enriquecido mais ainda meu trabalho com suas constantes, pertinentes idéias e sugestões.

A Profa. Dra. Rílvia S. de Santiago Aguiar pelas sugestões que muito enriqueceram este trabalho, como por exemplo, a escolha do título desta dissertação.

A Prof^ª. Dra. Sueli Rodrigues e a Prof^ª. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo pela colaboração na correção deste trabalho.

Aos amigos do laboratório GPBio Anny Kamilly, Álvaro, Ana Iraydi, Betty, Cleiton, Cristiane, Darlane, Diana, Diego, Diogo, Emanuel, Iuri, Ítalo, Felipe Sá, Jeferson, Jéssica, Juliana, Juliane, Jocélia, Jouciane, Kênia, Leonardo, Márcio, Regiane, Ticiane, Tigressa,

Valderez, obrigada pelo companheirismo de todos, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração. Em especial a minha amiga Anne Kamilly, pela amizade, pela palavra amiga sempre no momento certo. Ao Iuri Torquato e Felipe Sá que dedicaram seu tempo e trabalho ao ajudar no andamento das minhas pesquisas, sou muito grata. A Juliana Rabelo que se dispôs em me ajudar no começo da minha pesquisa e sempre que precisei também contribuiu com sua amizade, admiro-a muito. A Tigressa Helena por ser sempre uma pessoa prestativa e paciente que ajuda a todos. A Darlane pela ajuda quando precisei. A Valderez também por ter me ajudado no início da minha pesquisa e quando precisei, fico grata.

Aos amigos do laboratório GPTA, agradeço pela recepção. Meu agradecimento e admiração pelo profissionalismo ao Filipe Xavier que se dispôs em me ajudar sempre que precisei.

Incluo, de forma especial, a Sonia Coelho Abreu de Oliveira, engenheira de alimentos do NUTEC, agradeço a grande participação na minha vida profissional e pessoal, e pela amizade da Ticiane Coelho Abreu de Oliveira, estendendo este agradecimento a todos profissionais do DITAL/ NUTEC, Sávio, Silvâna, Marcinha, Olinda, Conceição, Luíza meus sinceros agradecimentos.

A Profa. Dra. Sandra de Aguiar Soares, que gentilmente possibilitou a caracterização química das amostras de surfactina.

A Profa. Dra. Maria Estela Aparecida Giro, que contribuiu também na realização deste trabalho, uma profissional em que tive oportunidade de conhecer e trabalhar, sou muito grata.

A Profa. Dra. Vânia Maria Melo, do Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, por todo o seu conhecimento, e por ceder gentilmente os microrganismos estudados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio J. G. Cruz, por sua gentileza em ter passado seus conhecimentos sobre a operação do biorreator.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra, da Embrapa Agroindústria Tropical, por todo o seu conhecimento e por gentilmente ter cedido a segunda remessa do glicerol para o laboratório.

A todos os bolsistas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Biologia – UFC, meu reconhecimento, sempre que precisei utilizar algum equipamento.

A Universidade Federal do Ceará pela infra- estrutura e oportunidade concedida para a realização de um ensino de qualidade.

Enfim, a todos os professores, funcionários, amigos e colegas do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Cada dia é uma história, cada passo uma conquista e cada pedra no caminho é uma forma de amadurecimento. E, mesmo que o tempo passe, e que as coisas mudem, é olhando para trás que nos damos conta que simplesmente vivemos...”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Os biossurfactantes formam moléculas anfipáticas, que possuem em sua estrutura química segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, espacialmente separados que auxiliam a formação de emulsões e disponibilizam compostos à célula microbiana. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão. Com isso, este trabalho foi dividido em seis etapas: a primeira tendo como objetivo avaliar a produção de biossurfactante a partir da glicerina, proveniente da produção do biodiesel de soja, pela cepa comercial de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, possível produtora de biossurfactante que foi selecionada devido a sua habilidade em sintetizar biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono; a segunda, resolveu-se avaliar o potencial de produção de surfactina por cepas de *Bacillus sp.* não patogênicas isoladas da Estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal do Ceará, com propósito de avaliar o maior potencial de produção do biossurfactante; a terceira, avaliar e otimizar experimentalmente a produção de biossurfactante em mesa agitadora, utilizando a cepa selecionada durante o *screening*; a quarta, produção do biossurfactante utilizando biorreator de 4 L; a quinta, caracterizar o biossurfactante produzido, determinando os grupos funcionais, os estudos de conformação e estrutura dos compostos; a sexta, estudar o poder de emulsificação do biossurfactante através da construção de diagramas de fases para uma posterior aplicação do emulsificante. Inicialmente, foi analisada uma cepa produtora de biossurfactante de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), cultivada em meio de cultura contendo glicerina, um resíduo da indústria do biodiesel, como fonte de carbono e energia, a fim de avaliar a viabilidade desta matéria-prima na síntese de biossurfactante. Uma concentração máxima de surfactina de 158,14 mg.L⁻¹ foi obtida. Posteriormente, um *screening* com sete cepas isoladas de *Bacillus sp.* foi realizado quanto ao crescimento e produção de biossurfactante a partir da glicerina. Apenas duas cepas (LAMI005 e LAMI009) foram selecionadas através de dois métodos indiretos, quanto a redução da tensão superficial e a capacidade de emulsionar três fontes hidrofóbicas (querosene, óleo de soja e n-hexadecano). Foi avaliada a cinética de crescimento e a produção de biossurfactante para as cepas selecionadas e o melhor resultado em frascos de Erlenmeyer foi realizado com *Bacillus subtilis* LAMI005, com concentração de surfactina de 441,06 mg.L⁻¹ e tensão superficial que manteve-se numa faixa estável de 28,8 ± 0,05 mN.m⁻¹ com uma concentração micelar crítica (CMC) de 19,8 mg.L⁻¹. Posteriormente, ensaios foram realizados em biorreator de 4L, porém não se atingiu a concentração de surfactina produzida em mesa agitadora, devido, provavelmente, a condições de aeração, que não foi monitorada quando os ensaios foram realizados em frascos agitados. A surfactina produzida em biorreator foi submetida a análises de espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), através destes espectros foi confirmado que o biossurfactante produzido tinha características similares a surfactina padrão da Sigma. O comportamento dos diagramas de fases demonstrou o potencial de emulsificação do biossurfactante produzido nestes experimentos, que é bastante positivo em relação à possibilidade de aplicações do biossurfactante analisado em diversos setores industriais.

Palavras-chave: Biossurfactantes, Emulsão, *Bacillus subtilis*, Glicerol e Surfactina.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules, which possess in their chemical structure hydrophobic and hydrophilic segments, separated spatially, that favor the formation of emulsions and improve the availability of compounds to microbial cell. Given these characteristics, emulsifiers reduce surface tension at the interface of immiscible phases, thereby allowing them to blend in, forming an emulsion. Thus, this study was divided into six stages: the first stage aimed at studying the biosurfactant producers using glycerol, a co-product of biodiesel production from soybean oil, the commercial strain of *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a known biosurfactant-producing was selected due their ability to synthesize biosurfactants from different carbon sources; the second stage aimed at studying the potential of *Bacillus sp.* strains, isolated from the tank of chlorination, at the Wastewater Treatment Plant on the “Campus do Pici” (WWTP-PICI), at the Federal University of Ceará, in producing biosurfactants; the third step was to experimentally evaluate and optimize the production of biosurfactant in *shaker*, using the strains selected during the *screening*; the fourth step was the process by using a 4 L batch bioreactor; the fifth step was to characterize the biosurfactant produced by determining the functional groups through studies of conformation and structure of compounds; and the sixth, to study the emulsifying power of the biosurfactant produced by the construction of phase diagrams for a subsequent application of the surfactant. Initially, a biosurfactant-producing strain of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) was cultivated in a culture medium containing glycerin, a residue of the biodiesel industry, as carbon and energy source, in order to evaluate the viability of this raw material in the synthesis of biosurfactants. A maximum concentration of surfactin of 158.14 mg. L⁻¹ was achieved. Next, a *screening* with seven strains of *Bacillus sp.* was performed aiming to study growth and biosurfactant production from glycerin. Only two strains (LAMI005 and LAMI009) were selected through two indirect methods, surface tension reduction and the ability to emulsify three hydrophobic sources (kerosene, soybean oil and n-hexadecane). Kinetics of growth and biosurfactant production was evaluated for the selected strains and best results in Erlenmeyer flasks was achieved with *Bacillus subtilis* LAMI005, 441.06 mg.L⁻¹ of surfactin concentration and the surface tension remained stable in the range of 28.8 ± 0.05 mN.m⁻¹ with a critical micelle concentration (CMC) of 19.8 mg.L⁻¹. Later, tests were conducted in 4L bioreactor, but the concentration of surfactin obtained during growth in *shaker* flasks were not achieved probably due to different aeration condition. The surfactin produced in bioreactor was subjected to analysis of the vibrational spectroscopy of Fourier transform infrared (FTIR), the spectra confirmed that the biosurfactant produced had similar characteristics to a standard of surfactin from Sigma. The behavior of phase diagrams showed the potential of the biosurfactant produced for emulsification, which is very encouraging regarding the possibility of biosurfactant applications in many industrial sectors.

Keywords: Biosurfactants, Emulsion, *Bacillus subtilis*, Glycerol and Surfactin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição do surfactante numa solução aquosa, efeito na tensão superficial e formação de micelas (CMC).....	25
Figura 2	Fases da emulsão.....	26
Figura 3	Estrutura da molécula de surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i>	38
Figura 4	Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.....	40
Figura 5	Colônias da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> em meio mineral suplementado com glicerol e em meio APGE, respectivamente.....	44
Figura 6	Representação esquemática do módulo biorreator modificado para a produção de surfactante por <i>Bacillus subtilis</i>	49
Figura 7	Cromatograma da análise de determinação do glicerol na concentração de 30 mg.L ⁻¹ . Realizado por cromatografia, com a coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7.8 mm) e a fase móvel de 0,1% H ₃ PO ₄ em água Mili-Q previamente filtrada, com um volume de injeção de 20 µL e uma vazão de 0,5 mL/min a 30° C.....	53
Figura 8	Cromatograma da análise da surfactina da Sigma-Aldrich, realizadas por cromatografia, para obtenção da curva padrão.....	54
Figura 9	Perfil de crescimento celular, produção de biosurfactante e consumo do substrato para ensaios realizados em <i>shaker</i> utilizando <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 a 30°C e 180 rpm, em meio mineral suplementado com glicerol. (●) Substrato; (■) Biomassa; (▲) Surfactina.....	62
Figura 10	Comportamento do pH e redução da tensão superficial em função do tempo para a cepa de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, ensaio realizado em <i>shaker</i> a 180 rpm, 30°C por 72 horas. (♦) Tensão superficial; (▲) pH.....	63
Figura 11	Atividade emulsificante do meio de cultivo produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, após 48 h de fermentação a 30 ° C e 180 rpm, contra a N-hexadecano, óleo de soja e querosene.....	64
Figura 12	Capacidade de emulsificação do meio de cultivo produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em (A) N- hexadecano, (B) óleo de soja e (C) querosene.....	65
Figura 13	Influência da concentração de surfactina na tensão superficial do caldo fermentado livre de células. (A) Tensão superficial pela concentração de	

	surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, após 48 horas de fermentação a 30 ° C e 180 rpm. (B) Tensão superficial em função do logaritmo da concentração de surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	66
Figura 14	Emulsificação (IE ₂₄ %) de óleo de soja, querosene e n-hexadecano em 48 h de fermentação pelas cepas de <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e LAMI009, respectivamente. Barras de erros representam o desvio padrão.....	70
Figura 15	Perfil de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo do substrato para ensaios realizados em <i>shaker</i> utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e LAMI009 a 30°C e 180 rpm. (A) LAMI005 e (B) LAMI009. (●) Substrato; (■) Biomassa; (▲) Surfactina.....	72
Figura 16	Comportamento do pH em função do tempo para as cepas de <i>Bacillus subtilis</i> (■) LAMI005 e (●) LAMI009, realizado em <i>shaker</i> a 180 rpm, 30°C por 72 horas.	73
Figura 17	Redução da tensão superficial em função do tempo para o ensaio realizado em <i>shaker</i> a 180 rpm, 30°C por 72 horas, com os <i>Bacillus subtilis</i> (■) LAMI005 e (●) LAMI009.....	74
Figura 18	Atividade emulsificante (unidades) do biossurfactante produzido em 48 h de cultivo por <i>Bacillus subtilis</i> (A) LAMI005 e (B) LAMI009 frente a diferentes substratos: a N-hexadecano, óleo de soja e querosene. Barras de erros representam o desvio padrão.....	76
Figura 19	Influência da concentração de surfactina na tensão superficial do caldo fermentado livre de células. (A) e (C) Tensão superficial pela concentração de surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e LAMI009, respectivamente, após 48 horas de fermentação a 30 ° C e 180 rpm. (B) e (D) Tensão superficial em função do logaritmo da concentração de surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e LAMI009, respectivamente.....	78
Figura 20	Perfil da biomassa e do oxigênio dissolvido em função do tempo durante a fermentação em biorreator a 30°C, 200 rpm e aeração de 1 L.min ⁻¹ , utilizando <i>B. subtilis</i> LAMI005, com concentração de 1% de inóculo. (■) Biomassa (g.L ⁻¹); (▲) oxigênio dissolvido.....	79

Figura 21	Perfil de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo do substrato para o ensaio com 10% de inóculo realizado em biorreator utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 a 30°C, 200 rpm e 1 L.min ⁻¹ . (●) Substrato; (■) Biomassa; (▲) Surfactina.....	81
Figura 22	Perfil da tensão superficial e do oxigênio dissolvido para o ensaio com 10% de inóculo realizado em biorreator utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 a 30°C, 200 rpm e 1 L.min ⁻¹ . (■) Tensão superficial; (....) Oxigênio dissolvido.....	81
Figura 23	Perfil de crescimento celular, oxigênio dissolvido e redução da concentração do ferro para os ensaios com 10% de inóculo em meio mineral contendo extrato de levedura (A) e sem adição de extrato de levedura (B), realizado em biorreator utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 a 30°C, 200 rpm e 1 L.min ⁻¹ . (■) Biomassa, (---) oxigênio dissolvido (●) concentração de ferro.....	82
Figura 24	Concentração de surfactina e consumo de substrato por <i>B. subtilis</i> LAMI005 em biorreator, a 30 ° C, 200 rpm e com uma taxa de aeração de 1,0 L.min ⁻¹ . (♦) consumo de substrato e (■) surfactina. (A) cepa cultivadas em meio de inóculo suplementado com extrato de levedura; (B) cepa cultivadas em meio de inóculo sem extrato de levedura.....	84
Figura 25	Produção de biossurfactante avaliada pela tensão superficial por <i>B. subtilis</i> LAMI005 em biorreator, a 30 ° C, 200 rpm e com uma taxa de aeração de 1,0 L.min ⁻¹ . (■) Cepa cultivada em inóculo com extrato de levedura; (▲) cepa cultivada em inóculo sem extrato de levedura.....	85
Figura 26	Atividade emulsificante (unidades) do meio de cultivo produzido em biorreator por cultivo com <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005, frente a diferentes substratos: a N-hexadecano, óleo de soja e querosene. (A) cepa cultivadas em meio de inóculo suplementado com extrato de levedura; (B) cepa cultivadas em meio de inóculo sem extrato de levedura. Barras de erros representam o desvio padrão.....	86
Figura 27	Fermentador de bancada utilizado para produção do biossurfactante de interesse.....	88
Figura 28	Coletor de espuma com um volume de 2 L conectado ao gás efluente do fermentador. O reciclo celular foi designado para devolver uma parte do	

	líquido da cultura de volta para o fermentador.....	89
Figura 29	Gráfico representativo para determinação da fase exponencial de crescimento dos ensaios fermentativos durante um período de 72 horas, utilizando <i>Bacillus subtilis</i> (A) LAMI005, (B) LAMI009 e (C) ATCC 6633 em meio mineral suplementado de glicerol, em <i>shaker</i> a 30°C, 180 rpm.....	90
Figura 30	Gráficos representativos das velocidades específicas dos ensaios fermentativos em <i>shaker</i> a 30°C, 180 rpm por 72 horas, utilizando os <i>Bacillus subtilis</i> (A) LAMI005, (B) LAMI009 e (C) ATCC 6633. (—) μ_x , (—) μ_s , (—) μ_p	92
Figura 31	Estrutura química da principal isoforma da surfactina.....	94
Figura 32	Espectro na região do infravermelho da molécula de surfactina padrão da Sigma e o da surfactina extraída, respectivamente.....	95
Figura 33	Emulsificação do óleo de motor pelo biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 em meio mineral suplementado com glicerol..	97
Figura 34	Ilustração final da construção dos diagramas de fases (surfactina – óleo de motor), (surfactina – óleo de mamona) e (surfactina – óleo NH 140), respectivamente, com composições de 10 a 50 % de solução de surfactina após temperatura de 85 °C.....	98
Figura 35	Diagrama de fases para o sistema de solução de surfactina e fase oleosa em função da temperatura. (A) Óleo de motor; (B) óleo de mamona; (C) óleo NH 140. E - fase emulsionada; A - fase aquosa em excesso; O - fase óleo.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	27
Tabela 2	Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	32
Tabela 3	Descrição das cepas e número de acesso no GenBank com as respectivas porcentagens de identidades (máxima similaridade) entre elas.....	42
Tabela 4	Composição do meio mineral (MM1).....	45
Tabela 5	Composição do meio mineral (MM2).....	45
Tabela 6	Composição da solução de micro nutrientes.....	46
Tabela 7	Caracterização dos micro elementos da glicerina resultante da transesterificação do óleo de soja.....	60
Tabela 8	Índice de emulsificação (%) em diferentes fontes hidrofóbicas utilizando o microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, em meio mineral suplementado de glicerol realizado em <i>shaker</i> a 30°C e 180 rpm.....	64
Tabela 9	Tensão superficial em meio fermentado livre de células de diferentes linhagens de <i>Bacillus sp.</i> não patogênicas, isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, cultivado em meio mineral suplementado com 2% (v / v) de glicerina como fonte de carbono após 48 horas de cultivo.....	67
Tabela 10	Avaliação da atividade de emulsificação (IE ₂₄ %) de óleo de soja, querosene e n-hexadecano dos produtos de fermentação das cepas de <i>Bacillus sp.</i> isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, cultivado em meio mineral suplementado com 2% (v / v) de glicerina como fonte de carbono após 48 horas de cultivo.....	68
Tabela 11	Densidade óptica e pH final do meio fermentado livre de células de diferentes linhagens de <i>Bacillus sp.</i> não patogênicas, isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, cultivado em meio mineral suplementado com 2% (v / v) de glicerina como fonte de carbono após 48 horas de cultivo.....	69
Tabela 12	Índice de emulsificação (%) em 48 h de fermentação em diferentes fontes hidrofóbicas utilizando o microrganismo <i>Bacillus subtilis</i>	

	LAMI005 e LAMI009, em meio mineral suplementado de glicerol realizado em <i>shaker</i> a 30°C e 180 rpm.....	76
Tabela13	Produção de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005, em biorreator 4 L de volume útil a 30°C, 200 rpm e aeração de 1 L.min ⁻¹ , utilizando 1% (v/v) de inóculo.....	80
Tabela14	Informações sobre as fases de adaptação, fases exponencial e crescimento dos microrganismos avaliados para a produção de biossurfactante a partir de glicerol.....	91
Tabela15	Avaliação da estabilidade emulsificante através da análise do (IE _{24%}) do biossurfactante produzido pelo <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005, frente a diversas fontes hidrofóbicas, para a construção do diagrama de fases.....	96

LISTA DE SÍMBOLOS

E_{24}	Índice de emulsificação
H_{EL}	Altura da emulsão formada
H_s	Altura total da solução
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular
μ_p	Velocidade específica de formação do produto
μ_s	Velocidade específica do consumo do substrato
dx/dt	Variação da biomassa com o tempo
d_s/dt	Variação do substrato com o tempo
dp/dt	Variação do produto com o tempo
$\mu_{x\text{máx}}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima
t	Tempo
$Y_{P/X}$	Produtividade de biossurfactante em relação a biomassa
P	Concentração final de biossurfactante
P_0	Concentração inicial de biossurfactante
X	Concentração final de biomassa
X_0	Concentração inicial de biomassa
y	Produtividade (relação entre a produção e o tempo)
P_f	Concentração de biossurfactante
E	Fase emulsionada
A	Fase aquosa em excesso
O	Fase óleo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Biossurfactantes.....	22
2.1.1	Atividade e Propriedades dos biossurfactantes.....	23
2.1.2	Classificação dos biossurfactantes.....	25
2.1.3	Produção de biossurfactantes.....	28
2.1.4	Aplicação dos biossurfactantes.....	31
2.1.5	Biossurfactante e Emulsificação.....	35
2.2	Gênero <i>Bacillus</i>	37
2.3	Surfactina.....	38
2.4	Fonte de carbono de origem renovável.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	Microrganismos.....	42
3.2	Matéria – prima.....	43
3.2.1	Caracterização da Matéria-prima.....	43
3.3	Meios e Condições de Cultivo.....	43
3.3.1	Meio de Manutenção.....	43
3.3.2	Meio de Propagação do Inóculo.....	44
3.3.2.1	Meio utilizado para a Produção do Inóculo na Fermentação em <i>Shaker</i>	44
3.3.2.2	Meio utilizado para Produção do Inóculo na Fermentação em Biorreator.....	45
3.3.3	Meio de Cultivo de Produção do Biossurfactante.....	45
3.3.3.1	Meio de Cultivo utilizado na Produção de Biossurfactante em <i>Shaker</i>	46
3.3.3.2	Meio de Cultivo utilizado na Produção de Biossurfactante em Biorreator.....	46
3.3.4	Procedimento Experimental.....	47
3.3.4.1	Condições de Cultivo em <i>Shaker</i>	47
3.3.4.2	<i>Screening</i> para avaliar a Produção de Surfactina com diferentes Cepas de <i>Bacillus sp.</i> Isoladas.....	47
3.3.4.3	Condições de Cultivo em Biorreator.....	49
3.3.5	Métodos Analíticos.....	50
3.3.5.1	Concentração de Biomassa.....	50
3.3.5.2	pH do Meio de Cultivo.....	51

3.3.5.3	Determinação do Índice de Emulsificação.....	51
3.3.5.4	Determinação da Atividade Emulsificante	52
3.3.5.5	Determinação da Tensão Superficial.....	52
3.3.5.6	Determinação da Concentração Micelar Crítica.....	52
3.3.5.7	Determinação da Concentração de Substrato	53
3.3.5.8	Determinação da Concentração de Surfactina.....	54
3.3.5.9	Concentração de oxigênio dissolvido.....	54
3.3.5.10	Determinação da Concentração de Ferro.....	55
3.3.6	Extração e Purificação do Biossurfactante.....	55
3.3.7	Cálculo dos Parâmetros de Fermentação da Produção de Surfactina	56
3.3.8	Fator de Conversão	57
3.3.9	Determinação da Fase Exponencial de Crescimento.....	57
3.3.10	Determinação da Produtividade.....	58
3.3.11	Caracterização Estrutural do Biossurfactante Produzido.....	58
3.3.11.1	Espectrometria na região do Infravermelho (FT-IR).....	58
3.3.12	Comportamento de Fases de Sistemas Emulsionados.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
4.1	Caracterização da Glicerina de Soja.....	60
4.2	Avaliação do Potencial de Produção de Biossurfactante em <i>Shaker</i> a partir de glicerina residual do biodiesel.....	61
4.2.1	Avaliação do Crescimento Microbiano, Consumo de Substrato, Produção de Surfactina.....	61
4.2.2	Avaliação do pH e da Atividade Superficial do Meio de Cultivo por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	62
4.2.3	Avaliação das Propriedades Emulsionantes do Meio de Cultivo por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 663.....	63
4.2.4	Determinação da Concentração Micelar Crítica.....	64
4.3	<i>Screening</i> para avaliar a Produção de Surfactina a partir do Glicerol.....	66
4.4	Produção de Biossurfactante em <i>Shaker</i> por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e LAMI009.....	70
4.4.1	Avaliação do Crescimento Microbiano, Consumo de Substrato, Produção de Surfactina.....	70
4.4.2	Avaliação do pH.....	73

4.4.3	Avaliação da Atividade Superficial do Meio de Cultivo Livre de Células.....	74
4.4.4	Avaliação das Propriedades Emulsionantes do Meio de Cultivo Livre de Células.....	74
4.4.5	Concentração Micelar Crítica.....	77
4.5	Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 em Biorreator...	78
4.5.1	Influência da Concentração do Inóculo na Produção de Biossurfactante em Biorreator.....	78
4.5.2	Influencia da Adição de Extrato de levedura no Crescimento Celular por <i>B. subtilis</i> LAMI005.....	82
4.5.3	Avaliação da Influência da Adição de Extrato de levedura na Produção de Biossurfactante.....	84
4.6	Cinética da Produção de Surfactina, Crescimento Celular e Consumo do Substrato para os <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005, LAMI009 e ATCC 6633 para os ensaios conduzidos em <i>Shaker</i>	89
4.6.1	Determinação da Fase Exponencial de Crescimento.....	89
4.6.2	Classificação do Processo Fermentativo.....	91
4.7	Caracterização Química do Biossurfactante Produzido em Biorreator.....	92
4.7.1	Espectrometria no Infravermelho (FT-IR).....	92
4.8	Comportamentos de Fases de Sistemas Emulsionados.....	95
5	CONCLUSÕES.....	101
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
	ANEXO A.....	117
	ANEXO B.....	118
	ANEXO C.....	119
	ANEXO D.....	120

1 - INTRODUÇÃO

A evolução da biotecnologia acontece em alta velocidade, atendendo a um mercado cada vez mais competitivo e exigente, principalmente em se tratando de produtos que não agridam o meio ambiente e a necessidade de sustentabilidade ambiental. O advento da biotecnologia e as novas legislações de controle ambiental têm incentivado a pesquisa por surfactantes naturais como alternativas aos produtos já existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes.

A indústria mostra-se cada vez mais interessada na utilização de microrganismos que são excelentes sintetizadores de produtos de alto valor agregado. Entre os produtos metabolizados por microrganismos, encontram-se os biossurfactantes, os quais suscitam grande interesse em processos industriais (BEZERRA, 2006). A utilização de biossurfactante tem sido cada vez mais aceita no mercado em decorrência de seu alto potencial, a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e devido à sua vasta aplicação podendo ser utilizado em diversas áreas, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas, cosméticos, tratamento de efluentes, dentre outras (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004). Entretanto, os principais usos relacionam-se à indústria petrolífera, devido ao aumento da solubilidade dos componentes do petróleo na presença dos surfactantes. O potencial de recuperação de derivados de petróleo deve-se a sua utilização na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos (LIMA, 1996).

Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Por apresentarem tais propriedades, os biossurfactantes alteram o comportamento interfacial e o modo como outras moléculas se comportam nas interfaces e na solução, possibilitando a redução da tensão superficial e interfacial. Além da

formação de macro e micro emulsões em que os hidrocarbonetos possam solubilizar-se em água, ou vice-versa, exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, ação espumante, solubilidade e detergência (LANG & WULLBRANDT, 1999, RON *et al.*, 2001; VAN HAMME *et al.*, 2006). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo).

São produzidos extra ou intracelularmente por microrganismos - bactérias, fungos ou leveduras - durante o bioprocessamento, com a finalidade de facilitar a difusão passiva de substâncias insolúveis em água, para o interior da célula (SANTOS, 1997).

Essas moléculas são biodegradáveis, não tóxicas e podem ser produzidas *in situ* (por inoculação do próprio microrganismo no local de atuação do biossurfactante) ou *extra situ* por adição do biossurfactante previamente produzido em outro local (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; CARRILO, 1996).

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e a capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas. Porém, ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos no mercado, principalmente devido ao seu alto custo (MESSIAS, 2008; LIMA *et al.*, 2007; NITSCHKE e PASTORE, 2002; DAVIS *et al.*, 1999).

Apesar de apresentar diversas vantagens sobre os surfactantes químicos, os surfactantes microbianos ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto, ao uso de substratos caros e aos problemas causados pela intensa formação de espuma durante o cultivo aeróbio. Entretanto, este panorama pode ser significativamente modificado através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo e que permitam altas concentrações de biossurfactante (KOSARIC, 1992, ROCHA *et al.*, 2006), bem como, o emprego de processos integrados de recuperação e produção (HEYD *et al.*, 2008).

A glicerina constitui um dos principais sub-produtos associados a cadeia de produção de biodiesel, juntamente com a torta e o farelo resultantes do processamento de óleos vegetais. As rotas de obtenção de biodiesel são craqueamento, esterificação e

transesterificação, sendo esta última a rota predominantemente utilizada. O processo consiste na reação entre um triglicerídeo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador, fornecendo como produtos ésteres metílicos e glicerina ou glicerol como co-produto. O aumento da disponibilidade deste co-produto no mercado nacional associado à produção de biodiesel é estimado por empresas ligadas a este setor. Sabe-se que a cada 1.000 L de biodiesel produzido, cerca de 100 kg de glicerina são gerados (MOTA *et al.*, 2005).

Ressalta-se que a principal aplicação do glicerol é na indústria de cosméticos, saboaria e fármacos, setores que são incapazes de absorver o volume de glicerina gerado com a produção do biodiesel (GONÇALVES *et al.*, 2006). Portanto, haverá um excedente de glicerina no mercado, ocasionando a desvalorização deste produto. Entretanto, a glicerina constitui uma fonte de matéria-prima para produtos de alto valor agregado, como polímeros, obtidos através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas) e aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina, que também se apresentam como alternativa rentável para este co-produto (KARINEN *et al.*, 2006). Alternativa que se mostrou viável para a produção de surfactantes de origem biológica, também conhecidos como biossurfactantes, através da bioconversão da glicerina por fermentação, utilizando bactérias como *Bacillus subtilis*.

Espécies do gênero *Bacillus* produzem biossurfactantes lipopeptídicos. Dentre os lipopeptídicos produzidos por *Bacillus subtilis*, encontram-se com destaque a surfactina, que é um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos (NEU *et al.*, 1990; NITSCHKE E PASTORE, 2002), formada por uma cadeia carbônica e por um anel lactona composto de sete aminoácidos (STACHELHAUS *et al.*, 2002).

Portanto, a presente dissertação visa avaliar a bioconversão do glicerol, principal fonte de carbono proveniente da produção do biodiesel por transesterificação do óleo de soja, para crescimento e produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, com aplicação no preparo de emulsões.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Biossurfactantes

Os avanços na ciência e na tecnologia desde a revolução industrial têm aumentado esforços humanos para a exploração de recursos naturais. A evolução da biotecnologia acontece em alta velocidade, atendendo a um mercado cada vez mais competitivo e exigente, principalmente em se tratando de produtos que não agridam o meio ambiente e a necessidade de sustentabilidade ambiental. O advento da biotecnologia e as novas legislações de controle ambiental têm incentivado a pesquisa por surfactantes naturais como alternativas aos produtos já existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A biotecnologia permitiu ampliar o desenvolvimento de novos produtos baseados na capacidade sintética dos microrganismos. Esta perspectiva, relacionada a produtos de elevado interesse industrial, têm conduzido à investigação e ao desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias na produção de agentes surfactantes por microrganismos (STAMPFLI & NERSTEN, 1995).

Os biossurfactantes ou emulsificantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais. São compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, reduzem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, consistem de produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (FIECHTER, 1992) e apresentam grande diferença dos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica (COLLA e COSTA, 2003). A composição e rendimento dos biossurfactantes dependem das características do fermentador, do pH do meio, da composição dos nutrientes, do substrato e da temperatura utilizada (MULLIGAN *et al.*, 2001).

Devido ao petróleo ser um produto tóxico para os organismos e um poluente potencial do ambiente, contaminando diretamente os ecossistemas através da fuga natural dos seus lençóis, derrames de navios petroleiros, acidentes em refinarias ou plataformas de extração, entre outros, também apresenta benefícios para sociedade, como uma das principais fontes de energia. Estas evidências tornam urgente o desenvolvimento de tecnologias para diminuir o impacto ambiental ocasionado por estes compostos.

Nos últimos anos, o interesse por biossurfactantes tem aumentado significativamente já que estes são naturalmente biodegradáveis, característica que possibilita a diminuição do impacto ambiental (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

As bactérias são os maiores responsáveis pela produção destes compostos tensoativos; bactérias das famílias *Pseudomonacea* e *Bacillacea* são capazes de produzirem biossurfactantes eficientes na remoção de petróleo e seus derivados poluentes de água (BUENO *et al.*, 2010). Estes microrganismos transformam o óleo em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes menos agressivos ao ambiente.

A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, o aumento da preocupação ambiental combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes biológicos (BUENO *et al.*, 2010). O interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado nos últimos anos, devido às suas diversidades, características para o auxílio ambiental, a possibilidade de produção através de fermentações e suas potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde e indústrias de processamento de alimentos (KIM *et al.*, 2000).

O uso dos biossurfactantes nas indústrias é limitado devido aos altos custos de produção e recuperação, em comparação aos surfactantes quimicamente sintetizados. Contudo, nos últimos anos muita atenção vem sendo destinada aos biossurfactantes, devido à diversidade de suas características estruturais e propriedades físicas distintas (NITSCHKE e PASTORE, 2002), uma vez que as mesmas variam com o microorganismo e substrato usados, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos (MEDEIROS, 2009). Esta diversidade possibilita que estes compostos apresentem uma ampla variedade de propriedades físico-químicas que incluem emulsificação, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade, entre outras (LIMA *et al.*, 2007). Assim, os surfactantes químicos podem ser substituídos pelos biossurfactantes em muitas áreas de aplicação como agricultura, construção, limpeza de equipamentos industriais, indústrias de alimentos, bebidas, couro, papel, têxtil, metal, cosmético, farmacêutica, petrolífera e petroquímica (LIMA *et al.*, 2007).

2.1.1 – Atividade e Propriedades dos biossurfactantes

A eficácia dos compostos surfactantes é avaliada em função de algumas propriedades físicas deles próprios e das misturas que estabelecem com a água (SOUZA, 2009). Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes, como a redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas (CMC) baixas, solubilidade e poder detergente.

A CMC é um dos índices mais utilizados para avaliar a atividade surfactante, podendo ser definida, também, como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa (RUFINO, 2006). A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS *et al.*, 2007; SOUZA-SOBRINHO, 2007).

A ação de um surfactante, sua distribuição numa solução aquosa e o efeito na tensão superficial, estão apresentados na representação esquemática da Figura 1. A adição de um surfactante à água tende a saturar todas as interfaces (situações B e C), de modo que a partir de uma concentração denominada concentração micelar crítica (CMC) há a saturação do meio e a formação de micelas (situação D) (FARIAS, *et al.*, 2006).

A micela é a forma que o surfactante assume para melhorar a estabilidade na solução deixando as cadeias hidrofóbicas juntas e as cadeias hidrofílicas voltadas para a água (FARIAS, *et al.*, 2006). São as estruturas mais simples formadas por surfactantes em solução.

As micelas são formadas espontaneamente quando a concentração do surfactante em água é igual ou maior que uma concentração crítica (CMC). Acima e próximo da CMC, as micelas são aproximadamente esféricas e, muito acima dessa concentração, elas tendem a se alongar, tornando-se cilíndricas, cujo comprimento aumenta com a concentração de surfactante até formar a fase hexagonal, que é viscosa e birrefringente à luz polarizada (EVANS & WENNERSTRÖM, 1999).

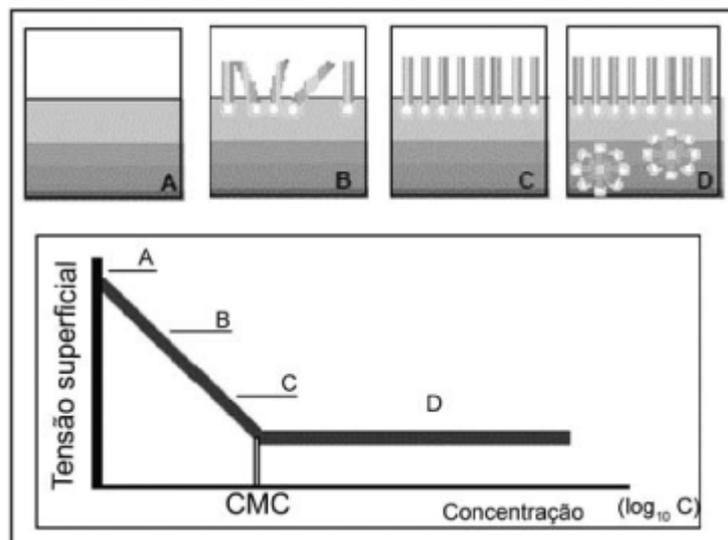


Figura 1 – Distribuição do surfactante numa solução aquosa, efeito na tensão superficial e formação de micelas (CMC). Fonte: FARIAS, *et al.*, 2006.

Os surfactantes produzidos microbiologicamente, oferecem várias vantagens sobre seus equivalentes surfactantes químicos, tais como: (a) aceitabilidade ecológica, por serem potencialmente aplicáveis em proteção ambiental pela sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (RAHMAN *et al.*, 2002); (b) são efetivos em ampla faixa de temperatura, pH e força iônica (MULLIGAN, 2005), muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de sal, enquanto que 2% de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais; (c) possibilidade de serem produzidos a partir de fontes renováveis (LIN *et al.*, 1993); (d) podem ser mais eficientes que os surfactantes sintéticos (BANAT, 1995; MEIRA, 2007). (e) atividade superficial e interfacial, por serem mais efetivos que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações. A concentração micelar crítica dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg.L⁻¹, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN.m⁻¹, respectivamente.

2.1.2 - Classificação dos biossurfactantes

Cada grupo de biossurfactante apresenta propriedades e funções fisiológicas diferentes, sendo que a maioria é constituída por porções hidrofílicas e hidrofóbicas distintas (MEIRA, 2007). A parte hidrofóbica (apolar) da molécula pode ser formada por ácidos graxos de cadeia longa, hidroxi-ácidos graxos ou por α -alquil- β -hidroxi ácidos graxos, é geralmente constituída de uma longa cadeia de hidrocarbonetos (linear ou ramificada), podendo variar de 8 a 18 átomos de carbono, tem afinidade pela fase orgânica (DELEU & PAQUOT, 2004). A porção hidrofílica (parte polar) pode ser composta por um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato e tem afinidade pela fase aquosa (MULLIGAN, 2005).

Os tensoativos podem ser classificados de acordo com a distribuição de suas fases. A Figura 2 demonstra graficamente as fases da emulsão (ARAÚJO, 1995):

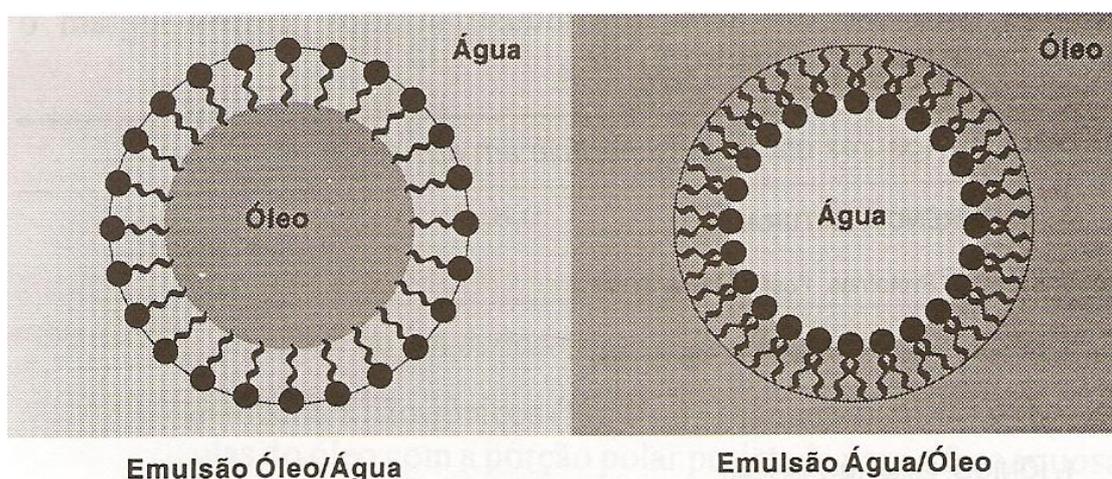


Figura 2 – Fases da emulsão. Fonte: ARAÚJO, 1995.

Micelas normais de surfactantes em água são pequenos agregados esféricos e cilíndricos, cujo interior é constituído pelo componente hidrofóbico do surfactante, e na região da superfície micelar encontram-se os grupos de extremidades polares dos surfactantes. O raio de hidratação dessas micelas é da ordem do comprimento das caudas do surfactante que as constituem.

A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra. Apenas alguns são catiônicos, como os que contêm grupamentos amina (LANG & WAGNER, 1897).

Uma grande variedade de microrganismos pode produzir biossurfactantes, sendo os mais conhecidos aqueles apresentados na Tabela 1. Os biossurfactantes também são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As

principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola e T.apícola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Surfactina	<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>

Fonte: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, através de bioprocessos. Açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros (SARUBBO *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2010).

De acordo com ROSENBERG e RON (1999), os biossurfactantes também podem ser classificados a partir da sua massa molar:

- Baixa massa molar: os glicolipídeos, que são os mais conhecidos, são formados por carboidratos e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa (ex: ramnolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos) e os lipopeptídeos (ex: surfactina, gramicidina S e polimixina).
- Alta massa molar: polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos (emulsan), lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (PIRÔLLO, 2006).

2.1.3 - Produção de biossurfactantes

Para a produção biotecnológica de surfactantes é necessário um correto balanço de nutrientes para promover condições adequadas de desenvolvimento e produção. A produção de biossurfactantes pelos microrganismos está intimamente ligada às condições ambientais e nutricionais fornecidas (ROSSMANN, 2008). A quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos pelas diversas espécies de microrganismos são influenciadas tanto pela fonte de carbono (NITSCHKE *et al.*, 2005) quanto pelas concentrações de nitrogênio (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002) e de micronutrientes como o ferro (WEI *et al.*, 2007), que são descritos como variáveis que afetam a produção desses compostos.

Todos os fatores que influenciam o crescimento microbiano afetam também diretamente a produção de biossurfactantes. A temperatura, o pH, a agitação e a disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes pelo seu efeito sobre o crescimento e as atividades celulares (DESAI e BANAT, 1997; ROSSMANN, 2008).

A produção de biossurfactantes pode ser induzida por hidrocarbonetos ou substratos insolúveis em água. Porém, os biossurfactantes também podem ser produzidos a partir de substratos solúveis em água, especialmente carboidratos (PINTO, *et al.*, 2009). Hidrocarbonetos e carboidratos estão envolvidos na síntese das porções hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente, das moléculas de biossurfactante. As seguintes possibilidades existem para a síntese das diferentes porções das moléculas de biossurfactantes e seu acoplamento: as porções hidrofóbicas e hidrofílicas são sintetizadas de forma independente; a

porção hidrofílica é sintetizada enquanto a síntese da porção hidrofóbica é induzida pelo substrato; a porção hidrofóbica é sintetizada, enquanto a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato e, a síntese de ambas porções hidrofóbica e hidrofílica é dependente do substrato (DESAI e BANAT, 1997; PINTO, *et al.*, 2009).

De acordo com PIRÔLLO (2006), a natureza insolúvel de substratos em meio aquoso, requer a existência de mecanismos que facilitem seu consumo. Estes substratos devem ser transportados de alguma forma para atingir o contato com a célula. Existem três formas de transporte de hidrocarbonetos até as células:

- (1) assimilação de hidrocarbonetos dissolvidos no meio, geralmente cadeias carbonadas curtas (menos de 10 carbonos) que apresentam solubilidade limitada em meio aquoso;
- (2) mecanismo de contato direto, no qual ocorre a formação de agregados compostos de células, gotas de hidrocarbonetos e ar, ocasionando um aumento na lipoficidade da superfície celular induzida pelo contato com o hidrocarboneto, que é absorvido pela célula através das camadas lipofílicas do envelope celular;
- (3) assimilação de hidrocarbonetos emulsificados, onde a partir do contato com a célula, o substrato é convertido em pequenas gotículas, ocasionando uma pseudo-solubilização através de agentes extracelulares produzidos pelas células (GOSWAMI *et al.*, 1990).

Os microrganismos utilizam uma grande variedade de fontes de carbono, incluindo substratos miscíveis em água e hidrofóbicos (ROSSMANN, 2008). A produção do biossurfactante parece estar relacionada com a proporção entre carbono e nitrogênio do meio de cultivo. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes (FONTES *et al.*, 2008).

A produção de biossurfactantes pode ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, porém diversos estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados ao meio. Segundo DESAI & BANAT (1997), a produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações do pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações de fonte de nitrogênio.

Além do carbono e nitrogênio, o ferro tem sido apontado na literatura como importante fator na produção destes compostos. O ferro é essencial aos microrganismos pois é requerido para diversas funções celulares. Além dos efeitos do ferro no metabolismo celular, foi observado que a adição de sais de ferro no meio de cultivo de *Bacillus subtilis* aumentou, significativamente, a produção do surfactante surfactina (WEI & CHU, 1998). SANTOS (2004) afirmou que a adição de ferro diminuiu a tensão superficial do meio para 26, 2 dina. cm^{-1} , sendo este valor um dos menores já reportados para biossurfactantes, somente comparado a surfactina produzida por *B. subtilis*. A composição de nutrientes no meio de cultura influencia a produção de surfactina por *B. subtilis*. A adição de ferro no caldo nutriente melhora a produção de lipopeptídeo (COOPER *et al.*, 1981).

Os biossurfactantes não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos no mercado, principalmente devido ao seu alto custo (MESSIAS, 2008; LIMA *et al.*, 2007; NITSCHKE e PASTORE, 2002; DAVIS *et al.*, 1999). Entretanto, esses custos poderão ser reduzidos, pela utilização de fontes renováveis e de baixo custo, ou ainda, pelo emprego de resíduos industriais. Neste caso, haverá ainda um benefício ao meio ambiente pela redução da carga de material poluente (ALMEIDA, 2002). Antes que os biossurfactantes sejam comercializados com sucesso, será necessário maximizar rendimento e produtividade do processo (ALMEIDA, 2002).

Existem diversas possibilidades de produção de biossurfactante (KOSARIC *et al.*, 1987):

1. Crescimento celular associado à produção de biossurfactantes:
 - 1.1. Indução da produção por adição de substratos lipofílicos
 - 1.2. Aumento da produção pela otimização da composição do meio;
 - 1.3. Aumento da produção pela otimização de fatores ambientais como pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação, etc.;
 - 1.4. Aumento da produção pela adição de compostos que ocasionem mudanças na permeabilidade da parede celular, como penicilina, EDTA, etc.;
 - 1.5. Aumento da produção pela adição de compostos que ocasionem uma alteração na ligação parede celular-biossurfactante em meios contendo alcanos, EDTA, querosene, etc.
2. Produção de biossurfactante em condição limitante de crescimento:

- 2.1. Produção sob limitação de nitrogênio;
- 2.2. Produção sob limitação de cátions multivalentes;
- 2.3. Aumento de produção por estresse causado pela variação das condições ambientais, como pH e temperatura;
3. Produção de biossurfactante por células em estarvação:
 - 3.1. Produção de células livres por estarvação;
 - 3.2. Produção de células imobilizadas por estarvação;
 - 3.3. Produção de células imobilizadas em estarvação com adição simultânea de matérias-prima renováveis;
4. Produção de biossurfactante pelo crescimento células livres e imobilizadas em estarvação com adição de precursores.

2.1.4 - Aplicação dos biossurfactantes

Devido às diferentes estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicação em diversos processos industriais. Ao considerar as potencialidades de aplicação dos biossurfactantes, deve-se lembrar que essas macromoléculas são produzidas por uma grande diversidade de microrganismos e que possuem diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com os similares sintéticos.

O uso de biossurfactantes em aplicações ambientais é bastante promissor devido a sua biodegradabilidade, tanto em água como em solos, e por serem menos tóxicos que os tensoativos químicos (MULLIGAN, 2005).

Devido ao seu alto potencial, o uso em diferentes áreas e o crescimento de seu consumo, a pesquisa na área dos biossurfactantes vem crescendo cada vez mais nos últimos anos. Assim, fica clara a necessidade de um aumento na produção de surfactantes em escala mundial.

O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, de-mulsificação, separação, solubilização e redução da

tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na construção civil, em indústrias de alimentos, papel, metal, têxteis e farmacêuticas, apresentando seu maior potencial de aplicação na indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques, na recuperação melhorada de petróleo e em casos de biorremediação, como em derramamentos de óleos em ecossistemas aquáticos (MULLIGAN *et al.*, 2001; COLLA e COSTA, 2003).

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

Tabela 2 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.

Função	Campos de Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Biorremediação, óleos, cosméticos, tintas, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Minação
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Banat *et al.*, 2000.

Grande parte da produção de biossurfactante (400-500 toneladas/ano) é usada nas aplicações relacionadas ao petróleo (BOGNOLO, 1999; PIRÔLLO, 2006). As aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais.

- Biorremediação

A biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente microrganismos, são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir (remediar) poluentes a níveis de concentração aceitáveis no ambiente. Para o caso da biorremediação de substratos altamente hidrofóbicos (imiscíveis em água) passa a ser limitada devido à dificuldade da sua utilização pelos microrganismos. Alguns microrganismos, porém, são capazes de produzir biossurfactantes, os quais apresentam propriedades emulsificantes, dispersantes e solubilizantes, podendo ocasionar a utilização de substratos hidrofóbicos e, por consequência, a detoxificação (BANAT *et al.*, 2000).

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Estima-se que a cada ano toneladas de petróleo bruto são derramadas em acidentes durante o transporte, rebentamentos de poços de petróleo, descargas ilegais de efluentes industriais e limpeza de tanques de navios no mar. O petróleo derramado flutua e alastra-se progressivamente, formando extensas manchas negras, denominadas marés negras, de efeitos altamente destruidores. Além dos seus efeitos imediatos, bem evidentes, há também os efeitos a longo prazo, com repercussões não menos graves (COLLA e COSTA, 2003).

Os vários componentes do petróleo são alcanos, cicloalcanos, aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, asfaltenos e resinas, sendo os alcanos de baixa massa molar os mais facilmente degradados pelos microrganismos (MULLIGAN, 2005). O petróleo contém compostos inibitórios do crescimento, mutagênicos e carcinogênicos que causam sérios problemas ao ambiente aquático e terrestre (PIRÔLLO, 2006).

Como os biossurfactantes aumentam a interação superficial A/O, eles aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995). A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumentam a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes; entretanto, os estudos ainda ocorrem a nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfactantes permanece ainda como um desafio (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

- Limpeza de reservatórios de óleos

Frações pesadas de óleos são mais viscosas e formam sedimentos sólidos no fundo dos tanques, sendo difícil a aspiração por meio de bombas. A lavagem requer o uso de solventes e a limpeza manual, que pode se tornar perigosa, demorada e de custo elevado. Outro problema é a preocupação com o destino das águas de lavagem e a perda econômica associada. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões concentradas de óleo em água, facilitando o bombeamento da emulsão formada e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. O bioemulsificante mais utilizado para este fim é o derivado de *Acinetobacter calcoaceticus*, denominado “emulsan”, cuja estrutura contém um ácido graxo e uma cadeia protéica ligada a um polissacarídeo (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN *et al.*, 2001).

A remoção de metais, que geralmente inclui a ação de ácidos, álcalis, complexantes, solventes solúveis em água, pode ser realizada pela ação de biossurfactantes. A surfactina, os raminolipídios e os soforolipídios são capazes de remover cobre e zinco de solos contaminados com hidrocarbonetos, devido ao caráter aniônico desses surfactantes. A surfactina apresentou uma remoção de cobre de 70% e de hidrocarbonetos de 50%, comparados com valores de 20 e 30% de remoção de cobre e hidrocarbonetos por um surfactante químico (MULLIGAN *et al.*, 1999; COLLA e COSTA, 2003).

- Indústria de alimentos

A propriedade de formação e estabilização de emulsões é a principal característica a ser influenciada pela adição de biossurfactantes em alimentos (NITSCHKE e PASTORE, 2002). De forma geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados (BERNHEIMER, 1970).

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (BANAT *et al.*, 2000). Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Outras aplicações para os emulsificantes são descritas, entre elas: melhorar a textura e a vida de prateleira de produtos contendo amido, pela formação de complexos com os componentes

destes; modificar as propriedades reológicas da farinha de trigo, pela interação com o glúten; melhorar a consistência e textura de produtos à base de gorduras, pelo controle de polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Sabe-se que os biossurfactantes, em geral, possuem baixa toxicidade, podendo ser aplicados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (BARROS, *et al.*, 2007). Estudos de toxicidade *in vivo* em ratos demonstraram que a LC₅₀ (letal concentration) da surfactina é 200 mg/kg em aplicações intramusculares e maior que 4 g/kg em aplicações orais (ARIMA *et al.*, 1968). Devido a essa baixa toxicidade *in vivo*, talvez não seja necessário que a surfactina seja completamente removida de produtos, porém a surfactina possui efeito hemolítico e inibe a formação de coágulo fibrinoso. Portanto, deve ser removida quando utilizada durante o processo produtivo de certos produtos (BARROS *et al.*, 2007).

- Outras aplicações

Os biossurfactantes podem ser aplicados em áreas como agricultura, para a formulação de pesticidas e herbicidas; nas indústrias farmacêuticas, como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral têxtil; em produtos de higiene e cosméticos, devido a sua compatibilidade com a pele; nas indústrias de papel, têxtil e cerâmica.

2.1.5 - Biossurfactantes e Emulsificação

Os emulsificantes em geral apresentam um segmento de sua molécula com propriedades anfipáticas, servindo por isso, para compatibilizar a mistura de água com óleos, fazendo pontes entre esses componentes, formando emulsões; esses compostos também são conhecidos como “surfactantes” (do inglês surfactant), “tenso-ativos”, “hipotensores” ou “emulsificantes”. Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, sólidos finamente divididos, etc., que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre as duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras estéricas e eletrostáticas. (SANTOS, 2008).

A formação de um filme molecular orientado de acordo com sua polaridade irá reduzir a tensão superficial e interfacial entre os líquidos imiscíveis, devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes.

A construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais as microemulsões existem e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes (FORMARIZ, 2004). A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que, mais convenientemente, represente a condição de aplicação.

As emulsões quando formadas, apresentam-se como uma única fase, entretanto são termodinamicamente instáveis e por este motivo tendem a se separar retornando a condição inicial de duas fases. A estabilidade das emulsões depende de vários fatores, sendo a presença de emulsificantes nas interfaces o principal fator de estabilização das emulsões, reduzindo assim a probabilidade da coalescência entre as gotas (AUFLEM, 2002). Para a formação de uma emulsão três requisitos são fundamentais: coexistência de dois líquidos imiscíveis, agitação suficiente para que um dos líquidos se apresente na forma dispersa de gotas e um emulsificante para estabilizar as gotas dispersas (CUNHA, 2007).

Ainda segundo CUNHA (2007), a temperatura é um importante fator na estabilização das emulsões, podendo afetar as propriedades físicas do óleo, da água, e do filme interfacial, podendo alterar também a solubilidade dos emulsificantes presentes nas fases óleo e água.

Segundo NIEVES (1987), durante o processo de quebra da emulsão os principais fenômenos que regulam a separação são: floculação, sedimentação e coalescência. Os dois primeiros fenômenos são caracterizados pelo empacotamento das gotas, sem perda da sua identidade. No caso da coalescência o filme interfacial deve ser interrompido.

As emulsões são empregadas em diversos segmentos industriais tais como na produção de fármacos, cosméticos, alimentos, tintas, etc. A estabilidade dessas microemulsões depende da escolha e da concentração do agente surfactante.

Entretanto, a possibilidade de formar microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença

de co-tensoativo (FORMARIZ, 2004). Para a formação espontânea dos sistemas microemulsionados, a tensão interfacial deve estar próxima de zero.

2.2 – Gênero *Bacillus*

A bactéria *Bacillus subtilis* é uma das mais citadas na literatura por produzir o biossurfactante conhecido como surfactina que reduz consideravelmente a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m. Algumas espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas pela sua capacidade de produzir compostos com propriedades tensoativas, dentre estes, destaca-se a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, considerada como um dos mais potentes biossurfactantes já conhecidos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

É uma bactéria gram-positiva, produtora de esporo, que apresenta morfologia, composição enzimática e química que lhes garante uma resistência a condições adversas. Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp* são estáveis em concentrações de NaCl de 2 a 3%, as quais são suficientes para inativar surfactantes convencionais (BARROS *et al.*, 2007), em faixa de temperatura de 10 a 50°C e pH entre 5,0 a 12,0 (ROCHA, 2007).

Sabe-se que os biossurfactantes, em geral, possuem baixa toxicidade, podendo ser aplicados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. *Bacillus amyloliquefaciens* e outros membros do grupo do *Bacillus subtilis* são considerados como seguros. Alguns produtos celulares de linhagens de *Bacillus* possuem o status ‘GRAS’ (“Generally Recognized as Safe”). Alguns casos podem ser citados, como a preparação enzimática de pectato-liase de *Bacillus subtilis* (GRAS nº 114), α -amilase derivada de *Bacillus licheniformis* (GRAS nº 79) e pululanase de *Bacillus licheniformis* (GRAS nº 72). Apesar disso, *B. subtilis* e *B. licheniformis* parecem estar implicados em alguns casos de envenenamentos fatais por alimentos (BARROS *et al.*, 2007).

2.3 - Surfactina

Apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina na década de 60, somente nos anos 80 chamou a atenção de diversos pesquisadores como uma alternativa atraente para substituir os surfactantes sintéticos, os quais podem ser mais danosos ao ambiente (MAIER, 2003). Surfactantes produzidos por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*, além de serem obtidos por processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental, apresentaram efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (CUBITTO *et al.*, 2004), remoção de óleo de areia contaminada (COSTA, 2005), formação de emulsões estáveis em óleo (COSTA, 2005), bem como na biorremediação de solos altamente contaminados por zinco e cádmio (MULLIGAN *et al.*, 1999).

A surfactina, um lipopeptídeo produzido por algumas linhagens de *Bacillus subtilis*, também denominada de subtilisina ou serolisina, é um dos mais efetivos biosurfactantes conhecidos (ARIMA *et al.*, 1968; COOPER *et al.*, 1981; DESAI & BANAT, 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; REIS *et al.*, 2004). A caracterização da surfactina demonstrou ser este composto um lipopeptídeo cíclico, formado por uma cadeia de 7 aminoácidos, com suas extremidades covalentes ligadas aos grupamentos carboxila e hidroxila de um ácido graxo β – hidroxilado (Figura 3).

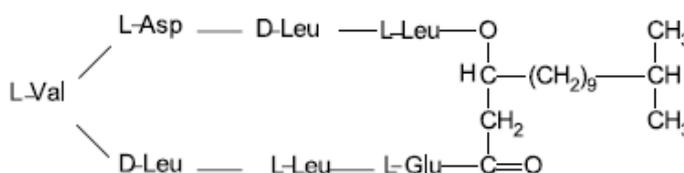


Figura 3 – Estrutura da molécula de surfactina produzida por *Bacillus subtilis*. Fonte: DESAI & BANAT, 1997.

Os surfactantes lipoprotéicos são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo melhor caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus sp*, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina (MAIER, 2003). Esse tipo de composto se caracteriza pela existência de peptídeos ligados a ácidos graxos, sendo que a porção protéica

da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos estão freqüentemente dispostos em uma estrutura cíclica (MAIER, 2003).

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (ARIMA *et al.*, 1968).

2.4 – Fonte de carbono de origem renovável

A utilização industrial dos biossurfactantes tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados ao uso de substratos dispendiosos. Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes, com baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produtos (GALLERT *et al.*, 2002). Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes.

A economia é outro grande desafio nos processos biotecnológicos, principalmente para produção de biossurfactante. O sucesso para produção de biossurfactante depende do desenvolvimento de processos mais baratos e a utilização de matéria-prima de baixo custo, as quais, não devem ultrapassar de 10 a 30% os custos do produto final (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

O crescimento da produção mundial de biodiesel está gerando um excedente de glicerol, subproduto da fabricação do biocombustível. Com o objetivo de reduzir os futuros problemas ambientais por acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais rentável, vem sendo estudado a implementação de estratégias biotecnológicas que utilizam o glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado como uma promissora alternativa e solução (RIVALDI *et al.*, 2008). Os preços estão diminuindo e vêm sofrendo forte pressão de queda em função da elevação da oferta, porque os mercados tradicionais do glicerol têm uma capacidade limitada de absorção de quantidades maiores do produto, especialmente nos mercados europeu e americano. Uma possível solução

seria o reaproveitamento de subprodutos industriais. Essa estratégia diminui os custos da produção do biossurfactante e, conseqüentemente, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente. Uma fonte de carbono de origem renovável para produção de produtos de alto valor agregado, importante atualmente, é o glicerol.

O excesso de glicerol proveniente da produção de biodiesel associado à baixa demanda mundial (0,5 bilhões ton/ano) e baixo custo, projetam um desequilíbrio econômico nas indústrias óleo químicas e de refino de glicerol, ao tempo de pôr em risco a sustentabilidade econômica de usinas de biodiesel no mundo. No Brasil, a maioria das plantas industriais de biodiesel não valoriza efetivamente o glicerol. A projeção do volume de glicerol no país para o ano 2013 é de 488 milhões e as perspectivas, nesse sentido, não são auspiciosas e poucas apresentam planos futuros para sua conversão em produtos de maior valor agregado (RIVALDI *et al.*, 2008).

O glicerol é, atualmente, obtido em grande quantidade através da reação de transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. A transesterificação consiste na conversão de óleos vegetais (triglicerídeo) e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (normalmente KOH ou NaOH), em biodiesel (mistura de ésteres) e glicerol (glicerina), (Figura 4). Na produção de biodiesel, proveniente da reação de transesterificação de óleos vegetais, são gerados 10% em volume de glicerina bruta. Dentro deste contexto, o glicerol constitui o maior subproduto gerado no processo de produção do biodiesel.

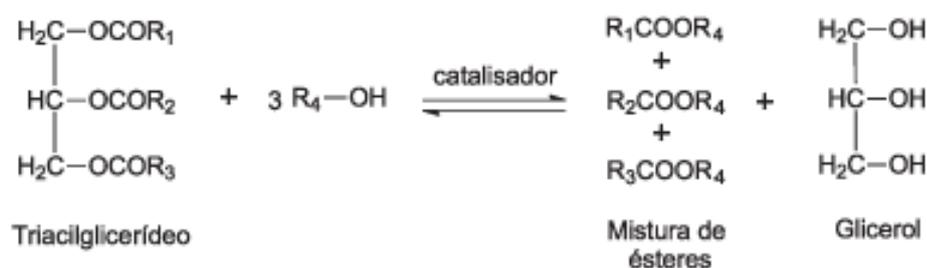


Figura 4 – Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo. Fonte: GERIS *et al.*, 2007.

A glicerina apresenta valor comercial, tendo ampla utilização na utilização em cosméticos (40%), utilização alimentícia (24%), síntese de resinas e ésteres (18%), aplicações farmacêuticas (7%) e outros (11%). Contudo, a glicerina obtida do processo de formação do

biodiesel é mais escura e possui impurezas, sendo o processo de purificação desta glicerina custoso. É amarelada e possui 9% de resíduos. Por causa da cor é chamada de glicerina loira e não tem um mercado definido, por isso é passível de um descarte inadequado (BRIEU, 2009).

A glicerina bruta difere da glicerina purificada que é utilizada na indústria, pois existem impurezas e colorações diferentes, o que dificulta seu uso em processos.

Os substratos hidrofílicos, como por exemplo o glicerol, glicose ou outros, são utilizados primeiramente pelo microorganismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos, como por exemplo os hidrocarbonetos, são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante (FONTES *et al.*, 2008).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Microrganismos

Neste trabalho foram estudadas diferentes cepas de *Bacillus*, a saber: *B. subtilis* ATCC 6633, obtido da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil), com código de acesso 0089 e sete cepas de *Bacillus sp.* não patogênicas, nomeadas por LAMI002, LAMI003, LAMI005, LAMI007, LAMI008, LAMI009 e LAMI011, pertencentes à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (Tabela 3), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo. Estas sete cepas foram isoladas do tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará - Brasil (ETE-PICI), identificadas pela sequência de rRNA 16S e depositadas no banco Genbank com os seguintes números de acesso: FJ413043, FJ413044, FJ413046, FJ413048, EU082292, FJ413049 e FJ413051, respectivamente.

Tabela 3 – Descrição das cepas e número de acesso no GenBank com as respectivas porcentagens de identidades (máxima similaridade) entre elas.

Cepas	Espécie	Identidade (%)	Nome NCBI	Depósito (GenBank)
Bc001	<i>Bacillus subtilis</i>	99	<i>Bacillus sp.</i> LAMI002	FJ413043
Bc002	<i>Bacillus subtilis</i>	99	<i>Bacillus sp.</i> LAMI003	FJ413044
Bc004	<i>Bacillus subtilis</i>	100	<i>Bacillus sp.</i> LAMI005	FJ413046
Bc006	<i>Bacillus megaterium</i>	99	<i>Bacillus sp.</i> LAMI007	FJ413048
Bc007	<i>Bacillus subtilis</i>	99	<i>Bacillus sp.</i> LAMI008	EU082292
Bc008	<i>Bacillus subtilis</i>	100	<i>Bacillus sp.</i> LAMI009	FJ413049
Bc010	<i>Bacillus licheniformes</i>	99	<i>Bacillus sp.</i> LAMI011	FJ413051

3.2 - Matéria – prima

A glicerina utilizada neste trabalho é um co-produto da produção do biodiesel, resultante da transesterificação do óleo de soja por metanol em meio alcalino (NaOH), posteriormente submetida a um pré-tratamento por hidrólise ácida, a temperatura ambiente, com H₂SO₄ concentrado e transferida para um funil de separação onde permaneceu em repouso durante 24 horas para separação das fases glicerínica e ácido graxo (SOUSA, 2008). Foi gentilmente fornecida pela Empresa Brasileira de Bioenergia Ind. Com. Ltda (EBB-NUTEC-CE, Ceará, Brasil).

3.2.1 - Caracterização da Matéria-prima

A amostra de glicerina tratada por hidrólise ácida foi caracterizada pela Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, quanto à presença dos seguintes micro elementos: Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, P e S. Os micro elementos Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn foram analisados através de absorção atômica em um equipamento Perkin Elmer Analyst 300, enquanto P e S foram analisados por espectrofotometria de UV-visível em espectrofotômetro 600 plus.

3.3 - Meios e Condições de Cultivo

3.3.1 - Meio de Manutenção

Para manutenção das bactérias *Bacillus sp.*, utilizou-se o meio APGE (contendo: 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). Todas as

culturas foram mantidas em meio de camada alta, sob refrigeração a 4°C e repicadas a cada 60 dias.

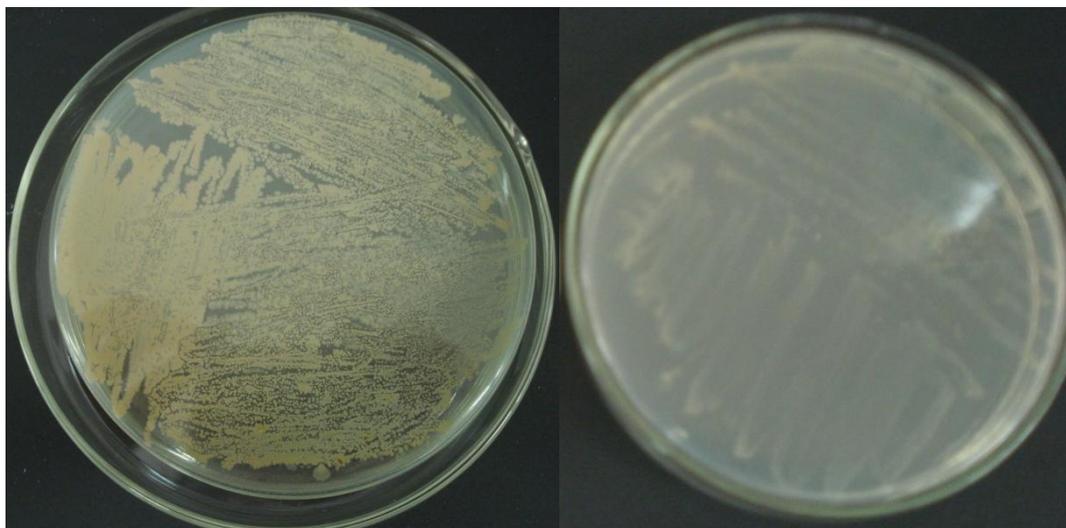


Figura 5 - Colônias da bactéria *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado com glicerol e em meio APGE, respectivamente.

3.3.2 - Meio de Propagação do Inóculo

3.3.2.1 - Meio utilizado para a Produção do Inóculo na Fermentação em *Shaker*

Os microrganismos foram inoculados em placas de meio APGE e incubados a 30° C por 24 h. Depois deste período, três alçadas de microrganismos foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de propagação do inóculo (PGE), composto de peptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹ e extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹, esterilizados por 15 min a 121° C em autoclave. Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil) a 180 rpm e a 30° C por 24 h. A densidade ótica do inóculo foi medida em espectrofotômetro (Spectronic ® 20 Genesys) a 600 nm, utilizando como branco o meio estéril. Visando a padronização do número de células iniciais em cada experimento, ajustou-se a densidade ótica entre uma faixa de 0,1 – 0,2 através de diluições com o próprio meio de inóculo estéril.

3.3.2.2 - Meio utilizado para Produção do Inóculo na Fermentação em Biorreator

Os microrganismos foram repicados em placas contendo meios minerais de composições distintas (Tabela 4 e 5), adicionado de 20 g.L⁻¹ de glicerol como principal fonte de carbono e 15,0 g.L⁻¹ de ágar, incubados a 30° C por 48 h. Após este período, três alçadas de microrganismos, foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio mineral de propagação do inóculo (Tabela 4) ou (Tabela 5). Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil) a 180 rpm e a 30° C por 24 - 48 h.

Tabela 4 - Composição do meio mineral (MM1).

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	13,99
KH ₂ PO ₄	6,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ .SO ₄	4,0
EXTRATO DE LEVEDURA	0,4

Fonte: Sar and Rosemberg (1983)

Tabela 5 - Composição do meio mineral (MM2).

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

Fonte: Morán *et al.*, 2000.

3.3.3 - Meio de Cultivo de Produção do Biosurfactante

3.3.3.1 - Meio de Cultivo utilizado na Produção de Biossurfactante em *Shaker*

Primeiramente, o meio mineral foi definido de acordo com SAR e ROSEMBERG (1983) (Tabela 4). O meio mineral foi esterilizado em autoclave a 110° C por 10 minutos. Foi acrescentado 0,1% (v/v) de solução de micro nutrientes (Tabela 6), previamente esterilizada por filtração (0.45 µm, Millipore, USA), segundo MORÁN *et al.* (2000). Finalmente, 2% (v/v) de glicerina, previamente esterilizada em autoclave a 121° C por 15 minutos, foi acrescentada ao meio mineral.

3.3.3.2 - Meio de Cultivo utilizado na Produção de Biossurfactante em Biorreator

Foram avaliados dois meios de cultivo (Tabela 4 e Tabela 5), adicionado de 2% (v/v) de glicerina, esterilizados em autoclave a 110° C por 10 minutos, acrescentando-se 0,1% (v/v) de solução de micro nutrientes (Tabela 6). A solução de micro nutrientes foi previamente esterilizada por filtração (0.45 µm, Millipore, USA), segundo MORÁN *et al.* (2000).

Tabela 6 - Composição da solução de micro nutrientes.

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.

3.3.4 - Procedimento Experimental

3.3.4.1 - Condições de Cultivo em *Shaker*

Nos ensaios conduzidos em mesa agitadora (*shaker*), inicialmente foi avaliada a cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633, como possível produtora de biossurfactante.

Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo em *shaker* rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil) a 180 rpm, 30° C. Os cultivos tiveram duração de 72 horas em condições isotérmicas e os experimentos foram conduzidos em triplicata. Adicionou-se 1 % (v/v) de inóculo em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral de cultivo (Tabela 4), adicionando 0,1% (v/v) de solução de micro nutrientes (Tabela 6), e como fonte de carbono, 2 % (v/v) de glicerol, proveniente da transesterificação do óleo de soja. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos. Foi determinada a concentração celular e o sobrenadante livre de células, foi submetido às análises de pH, índice de emulsificação (E_{24}), atividade emulsificante, tensão superficial, concentração micelar crítica (CMC) do ponto de maior concentração de biossurfactante, análise de substrato e surfactina.

3.3.4.2 - *Screening* para avaliar a Produção de Surfactina com diferentes Cepas de *Bacillus sp.* Isoladas

Realizou-se um *screening* com sete cepas de *Bacillus sp.* não patogênicas, isoladas da Estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal do Ceará, com objetivo de selecionar dentre as sete culturas microbianas isoladas as que apresentavam a maior capacidade de reduzir a tensão superficial do meio e formar emulsão, que é um indicativo da capacidade de produção de biossurfactantes.

Inicialmente, as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio APGE (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) e

incubadas a 30°C durante 24 horas para crescimento celular. Posteriormente, três alçadas de microrganismos foram repicadas e inoculadas em frascos de Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio PGE (peptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹), para crescimento do inóculo. Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil) a 180 rpm, a 30°C por 24 horas. Após 24 horas, em sua fase exponencial, uma alíquota do inóculo (1% v/v) foi inoculada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL de meio mineral (Tabela 4) para propagação da fermentação, acrescido de glicerol (2% v/v), como principal fonte de carbono e 0,1 % (v/v) de solução de micro nutrientes (Tabela 6). Os frascos acima mencionados foram incubados em *Shaker* rotatório (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil) a 30°C por 180 rpm durante 48 horas de cultivo. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C e o meio fermentado livre de células foi submetido a análises da produção de biossurfactantes. Dois métodos indiretos foram utilizados para monitorar a produção de biossurfactante no *screening*, a determinação da tensão superficial após 48 horas de cultivo e a determinação do índice de emulsificação em três fontes hidrofóbicas (querosene, n-hexadecano e óleo de soja), segundo COOPER e GOLDENBERG (1987) e RAMNANI *et al* (2005). Os resultados obtidos de tensão superficial foram analisados a partir da média e do erro de desvio padrão para cada cepa nos três ensaios conduzidos.

3.3.4.3 - Configuração do Biorreator

O biorreator utilizado é uma versão modificada de um fermentador convencional de 4 L Marconi (Marconi, São Paulo, Brasil), usando três impelidores para a agitação. Um coletor de espuma com um volume de 2 L foi conectado ao gás efluente do fermentador. O reciclo celular foi designado para devolver uma parte do líquido da cultura de volta para o fermentador. A espuma que transborda do coletor é transferida a um frasco com solução ácida, onde a surfactina é concentrada e precipitada em pH 2,0 para o isolamento preliminar do surfactante produzido (YEH *et al.*, 2006). O biorreator foi equipado com um sistema de aquisição de dados, empregando sinais da placa de aquisição da National Instruments (National Instruments, EUA) e as gravações foram realizadas utilizando uma medida de auto-

desenvolvimento e análise do software baseado em programação gráfica LABVIEW (National Instruments), Figura 6.

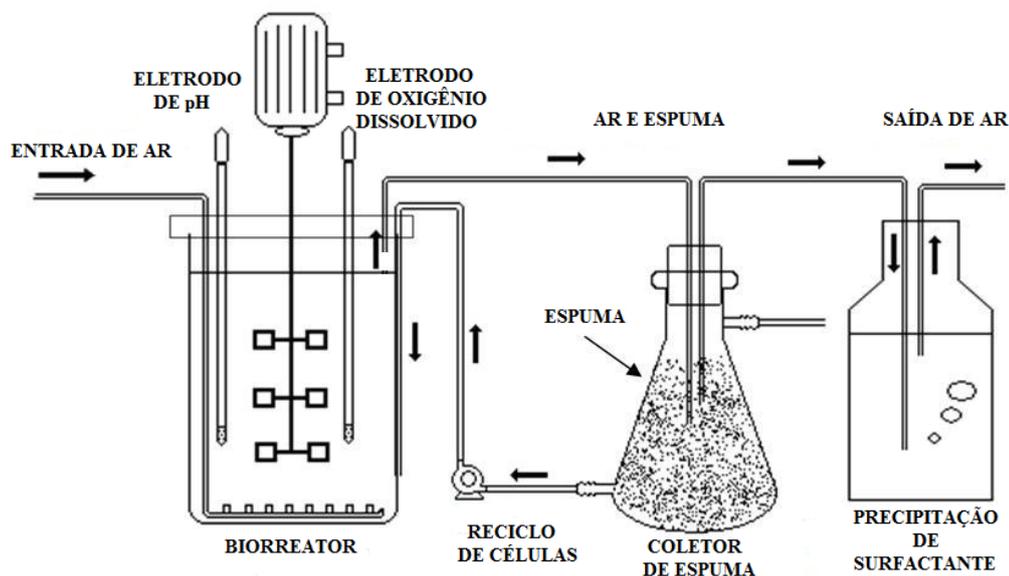


Figura 6 - Representação esquemática do módulo biorreator modificado para a produção de surfactante por *Bacillus subtilis*. Fonte: GIRO *et al.*, 2009.

3.3.4.4 - Condições de Cultivo em Biorreator

De acordo com os resultados obtidos em mesa agitadora (*shaker*), a cepa de *B. subtilis* LAMI005 por ter apresentado resultados satisfatórios com relação à maior produção de surfactina, foi escolhida para os ensaios subseqüentes em biorreator de bancada.

Com o objetivo de estudar a cinética de produção de biosurfactante, realizaram-se ensaios em biorreator de 4 L com diferentes condições de cultivo. Inicialmente, foi testada em biorreator de bancada a mesma condição utilizada na fermentação realizada em mesa agitadora (*shaker*), utilizando meio para inóculo (PGE), que foi adicionado (1 % v/v) ao meio mineral de cultivo MM1 (Tabela 4), acrescido de 2 % (v/v) de fonte de carbono (glicerina) e 0,1 % (v/v) de solução de micro nutrientes. Outro meio mineral (Tabela 5), que apresentou resultados satisfatórios em estudos realizados em frascos agitados, também foi testado na fermentação em biorreator. Foi analisada a adição de extrato de levedura ao meio mineral de

propagação do inóculo na produção do biossurfactante, foi utilizado meio para inóculo o MM2 (Tabela 5), suplementado de extrato de levedura ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) e 2 % (v/v) de fonte de carbono (glicerina). Foi adicionado 10 % (v/v) deste inóculo, na sua fase exponencial, em biorreator de bancada, que continha 3 L do MM2 (Tabela 5), com 2 % (v/v) de glicerina e 0,1 % (v/v) de solução de micro nutrientes. Também, foi realizado um ensaio com o meio para inóculo igual ao meio de cultivo, onde 10 % (v/v) do inóculo foi adicionado a 3L de meio de cultivo em fermentador de bancada, com adição de 2 % (v/v) de fonte de carbono (glicerina) e 0,1 % (v/v) de solução de micro nutrientes. Todas as fermentações foram conduzidas a 30°C , 200 rpm e com aeração de 1L.min^{-1} , com meio mineral autoclavado a 110°C por 10 minutos juntamente com a glicerina. A solução de micro nutrientes, previamente esterilizada por filtração, foi adicionada ao meio mineral em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Amostras foram coletadas em intervalos de tempos determinados, para a determinação de biomassa, e posteriormente, foram centrifugadas a 10 000 g por 15 minutos para retirada das células. O sobrenadante livre de células, foi submetido às análises de pH, índice de emulsificação (E_{24}), atividade emulsificante, tensão superficial, análise de substrato e surfactina.

3.3.5 - Métodos Analíticos

3.3.5.1 - Concentração de Biomassa

A concentração celular foi determinada medindo a densidade óptica das amostras, método indireto de turbidimetria, utilizando um espectrofotômetro de luz UV visível (Spectronic ® 20 Genesys) a 600 nm. Esse método baseia-se na medida de turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão. Apresentando a vantagem de ser de rápida execução envolvendo equipamentos relativamente simples. A concentração de biomassa foi determinada por peso seco obtido por filtração utilizando membrana Millipore de $0,45 \mu\text{m}$ de poro, previamente pesada. Neste procedimento, filtrou-se sob vácuo uma amostra de 5 mL do meio fermentado, depois lavou-se com três volumes de água destilada para remover

componentes do meio e colocou-se a amostra em estufa a 50°C até que se obtivesse peso constante. A concentração celular foi determinada utilizando uma curva de calibração (ANEXO A) que relaciona valores da densidade óptica e massa seca (ROCHA, 2007).

3.3.5.2 - pH do Meio de Cultivo

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente em torno de 27°C (ROCHA, 2007). No biorreator foi utilizado um potenciômetro de marca Hach, modelo ProP 3.

3.3.5.3 - Determinação do Índice de Emulsificação

O (E_{24}) foi determinado de acordo com COOPER e GOLDENBERG (1987), com modificações. Em um tubo de ensaio, com fundo chato, são colocados 2 mL do meio de cultura fermentado (livre de células), adicionando 2 mL de uma fonte hidrofóbica (querosene, n-hexadecano e óleo de soja). Essa mistura foi agitada em Vórtex por 2 minutos e deixada em repouso por 24 horas. Após 24 horas, foi medida a altura da emulsão formada em razão da medida da altura total (Equação1). O teste do índice de emulsificação também foi utilizado para analisar a estabilidade emulsificante do biossurfactante produzido como resultado positivo (sim) ou negativo (não) para a formação de emulsão.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \quad (1)$$

onde, H_{EL} é a altura da emulsão formada e H_S é altura total da solução.

3.3.5.4 - Determinação da Atividade Emulsificante

Atividade Emulsificante foi determinada de acordo com a metodologia descrita por CIRIGLIANO e CARMAN (1985), com pequenas modificações (GIRO *et al.*, 2009). As amostras foram filtradas através de uma membrana Millipore 0,45 μm e o filtrado (1 mL) foi colocado em tubos de ensaio (15 por 125 mm) e diluído com 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6). Em seguida, 0,5 mL de uma fonte hidrofóbica (querosene, n-hexadecano e óleo de soja) foi adicionada ao tubo de ensaio. Agitou-se em Vórtex durante 2 minutos, a emulsão resultante permaneceu em repouso por 10 minutos, em seguida, a absorbância da fase aquosa foi medida em espectrofotômetro (Spectronic ® 20 Genesys) a 540 nm. Foi utilizado como o branco (ponto zero), 1 mL da amostra filtrada e 1 mL do tampão acetato de sódio 0,1 M. Uma unidade de atividade emulsificante foi definida como a quantidade de biossurfactante que mudou a absorbância da emulsão formada a 540nm (A_{540}) por 1,0 nas condições descritas acima.

3.3.5.5 - Determinação da Tensão Superficial

A tensão superficial, uma medida indireta da produção de biossurfactante, foi determinada utilizando 30 mL de amostra do fermentado livre de células, mantido a 30° C, analisada em tensiômetro Kruss, modelo k6, utilizando o método do anel (ZAJIC & SEFFENS, 1984). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura.

3.3.5.6 - Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A determinação da CMC foi realizada através de medidas de tensão superficial do sobrenadante (livre de células) diluindo-se sucessivamente (volumes iguais de água) até se atingir um valor constante da tensão e o valor da tensão superficial se aproximar ao valor da água (72 mN/m), a uma temperatura de 30 ° C. O valor da CMC foi determinado em (g.L^{-1})

do biossurfactante isolado. A CMC é representada pelo ponto central da inflexão da curva do gráfico tensão superficial versus porcentagem de sobrenadante contendo o biossurfactante (SANTA ANNA *et al.*, 2002).

3.3.5.7 - Determinação da Concentração de Substrato

A concentração do substrato (glicerina) foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando cromatógrafo (Waters, Milford, MA), acoplado a um detector de índice de refração (Model 2414, Waters) equipado com uma coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7.8 mm). A fase móvel utilizada consistiu de 0,1% H_3PO_4 em água Mili-Q previamente filtrada, com um volume de injeção de 20 μL e uma vazão de 0,5 mL/min a 30° C. As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração (ANEXO C) com Glicerol P.A. 95 % da VETEC.

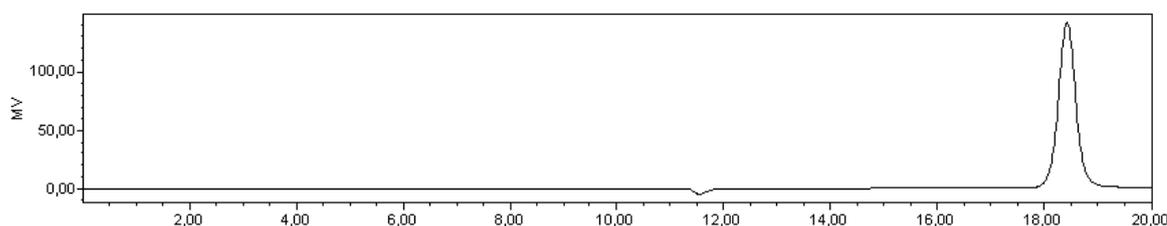


Figura 7 - Cromatograma da análise de determinação do glicerol P. A. na concentração de 30 $mg.L^{-1}$. Realizado por cromatografia, com a coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7.8 mm) e a fase móvel de 0,1% H_3PO_4 em água Mili-Q previamente filtrada, com um volume de injeção de 20 μL e uma vazão de 0,5 mL/min a 30° C.

Para as fermentações conduzidas em fermentador de bancada, foi utilizado o método enzimático colorimétrico para determinação dos triglicérides, através do kit enzimático da marca KATAL. O método consistiu em adicionar em um tubo de ensaio, 2 mL do reagente de cor e 0,02 mL da amostra de caldo metabólito livre de células, homogeneizar bem e por em banho-maria (Tecnal, modelo TE - 0541/1) a 37° C por 10 minutos. Posteriormente, a absorbância da mistura foi determinada a 500 nm em espectrofotômetro (Spectronic ® 20 Genesys). A concentração do glicerol foi determinada utilizando uma curva de calibração que relaciona valores da densidade óptica e concentração do glicerol.

3.3.5.8 - Determinação da Concentração de Surfactina

A concentração de surfactina foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado com detector UV (Waters, modelo 2487) a 205 nm e equipado com a coluna de fase reversa Symmetry C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Waters, Irlanda). Foi utilizada como fase móvel 20 % de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a temperatura ambiente, aproximadamente 27°C. O volume de injeção das amostras foi de 20 μ L. As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração (ANEXO B) com surfactina padrão 95 % da Sigma-Aldrich (YEH *et al.*, 2005).

A Figura 8 mostra um cromatograma para obtenção de uma curva de calibração da surfactina padrão 95 % da Sigma-Aldrich analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, com a finalidade de quantificar as amostras produzidas fermentadas. A concentração final de surfactina foi obtida através da soma dos picos, segundo WEI & CHU (1998), os picos foram seguidos de acordo com o cromatograma da Figura 8.

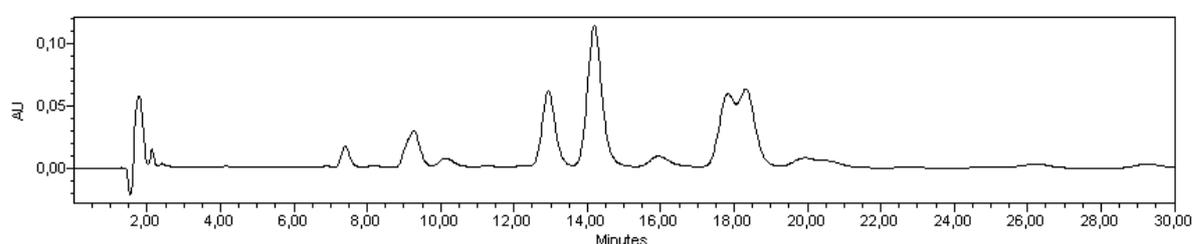


Figura 8 - Cromatograma da análise da surfactina da Sigma-Aldrich, realizadas por cromatografia, para obtenção da curva padrão. A concentração final da surfactina equivale a soma dos picos.

3.3.5.9 - Concentração de Oxigênio Dissolvido

Durante os cultivos realizados em biorreator, a pressão parcial de oxigênio dissolvido foi monitorada por eletrodo polarográfico esterilizável em autoclave da METTLER TOLEDO, modelo O₂ 4050.

3.3.5.10 - Determinação da Concentração de Ferro

Foi analisada neste estudo a concentração inicial e final de ferro durante o cultivo de *Bacillus subtilis* LAMI005 em biorreator para produção de biossurfactante. O ferro influencia significativamente o crescimento microbiano e a produção de biossurfactante (WEI & CHU, 1998).

O Ferro foi determinado através do método colorimétrico, utilizando o kit enzimático da marca KATAL, que é composto por um frasco Tampão, um frasco contendo solução aquosa de Ferrozine e um frasco Padrão de solução aquosa de íons de ferro. O método consistiu em adicionar em um tubo de ensaio (lavado com HCl 50 % e enxaguado com água destilada) 0, 250 mL da amostra de caldo metabólito livre de células, 1 mL do Tampão e uma gota de Ferrozine. A mistura foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria (Tecnal, modelo TE - 0541/1) a 37° C por 10 minutos. Posteriormente, a absorbância da mistura foi determinada a 546 nm em espectrofotômetro (Spectronic ® 20 Genesys), utilizando cubetas de vidro. A concentração do ferro foi determinada utilizando uma curva de calibração (ANEXO D) na faixa de $7,2 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹ que relaciona valores da densidade óptica e concentração do ferro.

3.3.6 - Extração e Purificação do Biossurfactante

As culturas foram conduzidas ao processo de fermentação e posteriormente, o caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C. O meio fermentado livre de células foi submetido a uma precipitação ácida, ajustado o pH para 2,0 pela adição de HCl 3M, de acordo com COSTA (2005). Isto se deve ao fato de que, em meio ácido, a surfactina precipita sem, contudo, ter sua estrutura alterada. Esta característica constitui uma vantagem adicional, pois, mesmo submetida a condições mais extremas de pH, há manutenção da estrutura química original. A solução resultante acima foi mantida em repouso durante 12 horas (over night) a 4° C, a fim de permitir a precipitação da surfactina, que foi recolhida por

centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, com finalidade de se obter a surfactina bruta. Para purificação, a surfactina bruta foi ressuspensa em 8 mL de água destilada pH 8,0, e foi extraída por três vezes, utilizando o mesmo volume de diclorometano (1:1) (Vetec, São Paulo, Brasil). Agitou-se por 5 minutos e deixou-se em repouso por 1 hora em funil de separação para que ocorresse a separação das fases. Todas as fases do solvente foram coletadas em beakers e evaporadas a temperatura ambiente, o produto obtido foi ressuspensa com 2 mL de metanol P.A (Vetec, São Paulo, Brasil) para análise posterior. Após filtração em membrana (0.45 µm, Millipore, USA), a surfactina purificada foi finalmente obtida.

3.3.7 – Cálculo dos Parâmetros de Fermentação da Produção de Surfactina

Para a representação dos parâmetros da produção de surfactina, foram utilizados os resultados das fermentações conduzidas em *shaker* (Tecnal – TE240, São Paulo, Brasil), em frascos de Erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral, em meio à base de glicerol (2% v/v), com os demais micronutrientes (0,1% v/v) utilizados no meio de produção da surfactina, acrescido de 1% (v/v) de inóculo, sob agitação de 180 rpm à 30°C, as amostras foram coletadas em diferentes tempos de fermentação com duração máxima de 72 horas, o cultivo foi conduzido em triplicata para aumentar a precisão dos resultados.

As taxas específicas de crescimento celular μ_x (h^{-1}), de formação de biosurfactante μ_p (h^{-1}), e de consumo de substrato μ_s (h^{-1}) foram expressos, respectivamente:

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \quad (3)$$

$$\mu_p = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} \quad (4)$$

Onde, X representa a biomassa, S representa o substrato e P representa o produto.

3.3.8 - Fator de Conversão

O valor médio do rendimento da produção de biossurfactante em relação a biomassa produzida ($Y_{P/X}$) foi calculado pela razão:

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (5)$$

Onde, P e P_0 representam a concentração final de biossurfactante e concentração inicial de biossurfactante, e X e X_0 representam a concentração final de biomassa e concentração inicial de biomassa.

3.3.9 - Determinação da Fase Exponencial de Crescimento

A existência de uma fase exponencial de crescimento celular é avaliada através de uma representação gráfica $\ln X$ vs t . Deste modo encontrou-se a velocidade específica de crescimento celular máxima ($\mu_{Xmáx}$), que foi determinada pela regressão linear dos dados de $\ln X$ vs. t durante a fase de crescimento exponencial (SCHMIDELL *et al.*, 2001), ou seja, igual ao maior coeficiente angular da equação da reta, $\ln X = f(t)$, encontrado entre os pontos experimentais, considerando para isto no mínimo três pontos experimentais e consecutivos.

3.3.10 - Determinação da Produtividade

$$y = \frac{Pf}{t} \quad (6)$$

Onde, P_f representa a concentração máxima de biossurfactante e t tempo de fermentação.

3.3.11- Caracterização Estrutural do biossurfactante Produzido

3.3.11.1 - Espectrometria na região do Infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (*Fourier Transform Infrared*) é uma ferramenta eficaz para a determinação de grupos funcionais e nos estudos de conformação e estrutura de compostos. Esta técnica estuda a interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria, analisando a transição das vibrações normais moleculares, permitindo a obtenção do espectro vibracional completo da molécula. A análise dos grupamentos químicos do surfactante foi realizada através dos espectros FTIR. Os espectros foram obtidos no espectrômetro da Shimadzu modelo FTIR-8300, numa faixa de frequência de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando-se pastilha de KBr.

3.3.12 - Comportamento de Fases de Sistemas Emulsionados

Para a construção do diagrama de fases, variou-se a quantidade de óleo e de surfactina no sistema de fase (Temperatura-Composição). A solução de surfactina em água pH 8,0 foi misturada em tubos de ensaio com tampa rosqueável a compostos hidrofóbicos (óleo de motor, óleo de mamona e óleo NH140), nas proporções de 10 a 50% de solução do biossurfactante. Foram homogeneizados em agitador de tubos (Vórtex) por 2 minutos. Os tubos foram submetidos às temperaturas de 30 a 85 °C, variando de 5 em 5 °C, foi necessário um tempo de estabilização de 10 minutos para cada mudança da temperatura. em banho maria-termostatizado (Tecnal, modelo TE-184). A cada 10 minutos foram verificadas as fases

existentes (Emulsão/Água/Óleo/Outra). O equilíbrio de fases foi determinado pela observação visual, utilizando uma lanterna de luz branca, para melhor verificar a mudança de fase.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Caracterização da Glicerina de Soja

A glicerina utilizada neste trabalho, um co-produto da produção do biodiesel, resultante da transesterificação do óleo de soja por metanol em meio alcalino (NaOH), foi gentilmente caracterizada pela Embrapa Agroindústria Tropical, para determinar os seguintes micro elementos: Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, P e S (Tabela 7).

Tabela 7 - Caracterização dos micro elementos da glicerina resultante da transesterificação do óleo de soja (MENDES *et al.*, 2010).

Elementos (mg/Kg)	
Ca	4,2
Mg	1,2
K	2312,5
Na	4987,5
Cu	ND
Fe	6,6
Mn	ND
Zn	ND
P	193,3
S	160

ND – não detectado

A partir dos resultados (Tabela 7) pode-se concluir que a glicerina de soja utilizada neste trabalho contém importantes nutrientes para ser utilizada como principal fonte de carbono e nutrientes na avaliação do crescimento celular e produção de surfactina por bactéria do gênero *Bacillus*. Potássio, sódio, fósforo e enxofre foram encontrados com maiores teores na glicerina utilizada, enquanto que, cobre, manganês e zinco ficaram abaixo

do limite de detecção do equipamento para a amostra de glicerina avaliada. Os teores de cálcio, magnésio e ferro foram detectados em menores proporções.

4.2 – Avaliação do Potencial de Produção de Biossurfactante em *Shaker* a partir de glicerina residual do biodiesel

Inicialmente, avaliou-se a produção de biossurfactante utilizando como fonte de carbono e energia a glicerina residual da produção do biodiesel. Para tal fim, selecionou-se uma cepa na literatura que já havia sido descrita como produtora de biossurfactante, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, que foi selecionado devido a sua habilidade em sintetizar biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono (REIS *et al.*, 2004).

4.2.1 - Avaliação do Crescimento Microbiano, Consumo de Substrato, Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

O efeito de um meio semi-definido, meio mineral utilizando glicerina como principal fonte de carbono, sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633 foi analisado neste trabalho através da determinação do crescimento celular, consumo de glicerol e concentração surfactina no sobrenadante do meio fermentado livre de células por 72 h. Os resultados (Figura 9) indicam que a cepa foi capaz crescer e produzir surfactina a partir da bioconversão da glicerina. Após 48 horas de cultivo, houve uma aumento da produção de surfactina, atingindo uma concentração de 158,14 mg.L⁻¹ em 72 h de fermentação. Ao mesmo tempo, um aumento na concentração de células foi observada, atingindo 1,69 g.L⁻¹, com uma máxima conversão do glicerol.

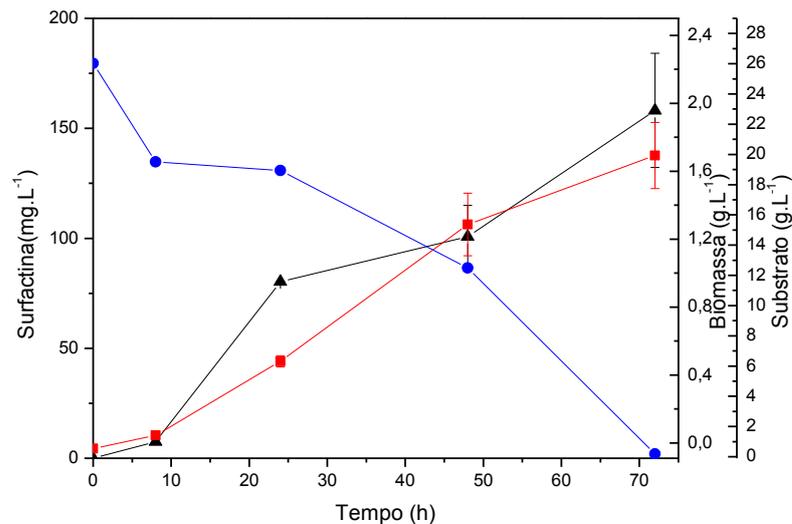


Figura 9 - Perfil de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo do substrato para ensaios realizados em *shaker* utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a 30°C e 180 rpm, em meio mineral suplementado com glicerol. (●) Substrato; (■) Biomassa; (▲) Surfactina. Barras de erros representam o desvio padrão da análise.

4.2.2 - Avaliação do pH e da Atividade Superficial do Meio de Cultivo por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

A Figura 10 apresenta o comportamento do pH e da tensão superficial durante o ensaio fermentativo em função do tempo. Pode-se observar que o valor do pH do meio fermentado manteve-se acima de 6,8, não ocorrendo a acidificação do meio. Este resultado é importante uma vez que muitos autores (BARROS *et al.*, 2008a; REIS *et al.*, 2004) descrevem a precipitação da surfactina, biossurfactante produzido por cepas de *Bacillus* em valores de pH menores do que 5,0.

Com relação aos resultados de tensão superficial do caldo fermentado livre de células, o menor valor de tensão superficial ($31,5 \pm 1,6 \text{ mN.m}^{-1}$) foi atingido após 72 h de fermentação, Figura 10. O microrganismo testado demonstrou sua capacidade de produzir biossurfactante, uma vez que a eficácia de um surfactante é determinada pela sua capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais. Segundo a literatura (GUDINA *et al.*, 2010), um bom surfactante reduz a tensão superficial da água 72,0 para $35,0 \text{ mN.m}^{-1}$, e a tensão interfacial entre a água e o hexadecano 40,0 para $1,0 \text{ mN.m}^{-1}$.

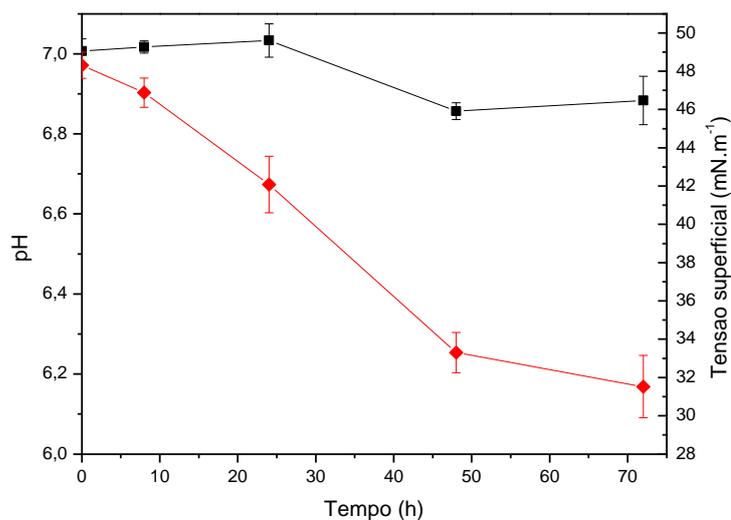


Figura 10 - Comportamento do pH e redução da tensão superficial em função do tempo para a cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ensaio realizado em *shaker* a 180 rpm, 30°C por 72 horas. (♦) Tensão superficial; (■) pH.

4.2.3 - Avaliação das Propriedades Emulsionantes do Meio de Cultivo por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

As propriedades emulsificantes do meio de cultivo que contém o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 cultivado em meio mineral suplementado com glicerol, foram determinadas através da determinação da atividade emulsificante, que determina a capacidade do biossurfactante em formar emulsão água e óleo, e o índice de emulsificação, que determina a capacidade do surfactante em formar emulsões em diferentes substratos hidrofóbicos, utilizando óleo de soja, querosene e n-hexadecano. Resultados da capacidade emulsificante podem ser vistos na Figura 11. Pode-se observar que atividades de emulsificação maiores e mais estáveis, estão em torno de 2 unidades e foram detectadas quando o óleo de soja foi utilizado como composto hidrofóbico. Observou-se que o biossurfactante produzido exibiu uma menor atividade emulsificante quando se utilizou o n-hexadecano como composto hidrofóbico, com aproximadamente 1,4 unidades.

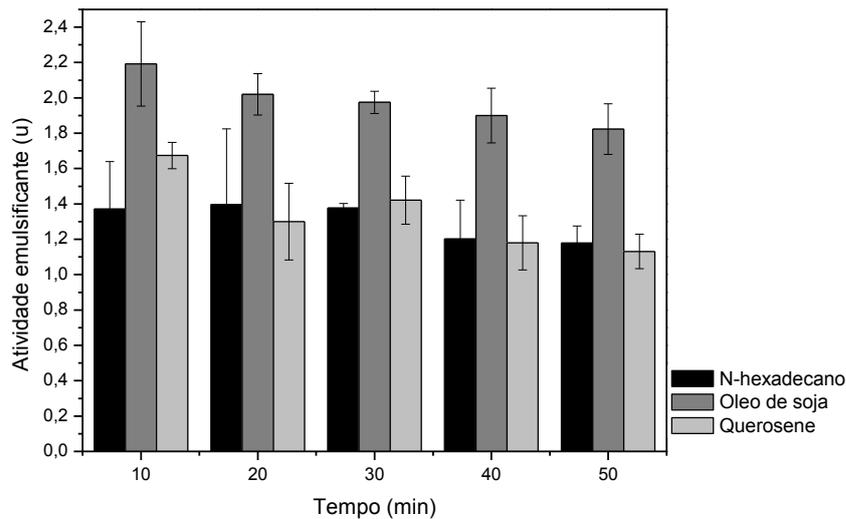


Figura 11 - Atividade emulsificante do meio de cultivo por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, após 48 h de fermentação a 30 °C e 180 rpm, contra a N-hexadecano, óleo de soja e querosene.

N-hexadecano, óleo de soja e querosene foram os hidrocarbonetos adicionados ao sobrenadante contendo o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, no intuito de avaliar o poder de emulsificação sobre estes compostos. O melhor resultado do E_{24} foi obtido usando n-hexadecano (53,3%), seguido pelo óleo de soja (43,3%), no tempo de 72 h de fermentação, onde se obteve a maior quantidade de biossurfactante produzido (Tabela 8). Não foi observada uma emulsão significativa com querosene como fonte hidrofóbica (Figura 12).

Tabela 8 - Índice de emulsificação E_{24} (%) em diferentes fontes hidrofóbicas utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, em meio mineral suplementado de glicerol realizado em *shaker* a 30°C e 180 rpm.

Hidrocarbonetos avaliados			
Tempo de fermentação	N- hexadecano	Óleo de soja	Querosene
(h)	(%)	(%)	(%)
48	46,6	46,6	33,3
72	53,3	43,3	33,3

Este ensaio não foi realizado em triplicata.

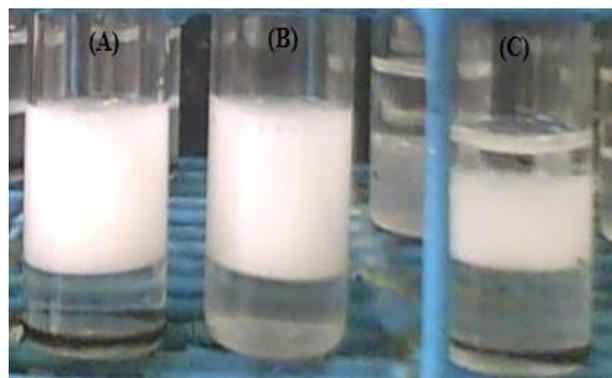


Figura 12 - Capacidade de emulsificação do meio de cultivo por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em (A) N-hexadecano, (B) óleo de soja e (C) querosene.

4.2.4 - Determinação da Concentração Micelar Crítica do Meio de Cultivo por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

A fim de determinar a concentração micelar crítica do surfactante produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 cultivado em meio mineral contendo glicerina como fonte de carbono, a relação entre a tensão superficial e a concentração de surfactina foi determinada e os resultados são apresentados na Figura 13. Pode-se observar uma diminuição progressiva da tensão superficial com o aumento da concentração de surfactina. A Figura 13 mostra os resultados de tensão superficial, associado a diferentes concentrações de surfactina no meio fermentado livre de células, durante 48 h de fermentação. Um semi-logaritmo da tensão superficial versus concentração de surfactina permitiu determinar o valor da CMC, como sendo $33,6 \text{ mg.L}^{-1}$. Um valor mínimo da tensão superficial de $32,3 \text{ mN.m}^{-1}$ foi obtido com a concentração de surfactina de $71,9 \text{ mg / L}$.

Segundo ROCHA (2007) o surfactante sintético SDS possui uma tensão superficial de $37,0 \text{ mN.m}^{-1}$ e uma CMC de 2120 mg.L^{-1} . REIS *et al.* (2004) obtiveram a CMC de $78,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e uma tensão superficial de $28,7 \text{ mN.m}^{-1}$. Em comparação, os resultados obtidos com *Bacillus subtilis* ATCC 6633 estão de acordo com aqueles obtidos a partir da literatura, o que mostra o potencial do uso da glicerina como fonte de carbono para a produção de surfactina por linhagens de *Bacillus subtilis*.

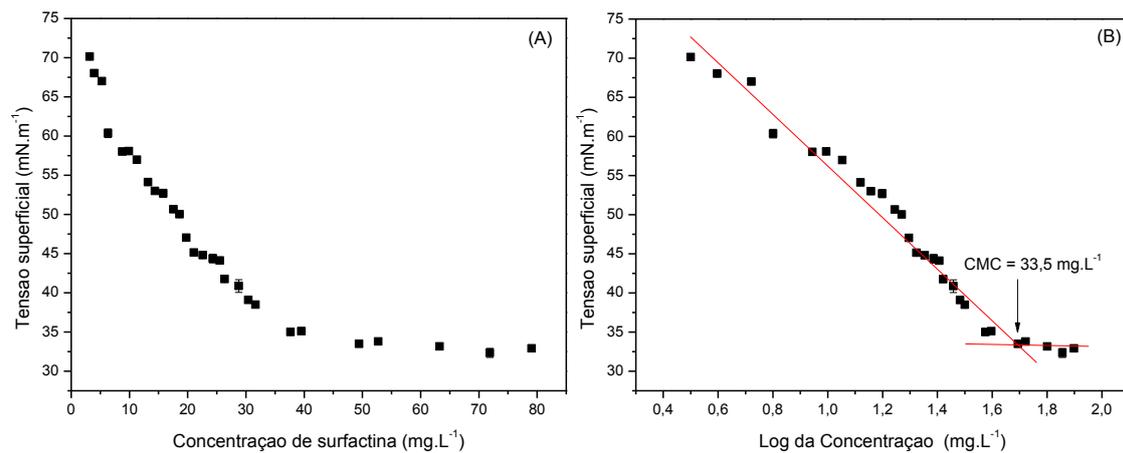


Figura 13 - Influência da concentração de surfactina na tensão superficial do caldo fermentado livre de células. (A) Tensão superficial pela concentração de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, após 48 horas de fermentação a 30 ° C e 180 rpm. (B) Tensão superficial em função do logaritmo da concentração de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

4.3 - Screening de cepas de *Bacillus* sp. visando a Produção de Surfactina a partir do Glicerol

A partir do meio utilizado em *shaker* para produção de biossurfactantes por *B. subtilis* ATCC 6633 inicialmente selecionado, foi avaliado o potencial de produção de surfactina por cepas de *Bacillus* sp. não patogênicas isoladas da Estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal do Ceará, com o propósito de selecionar a cepa com o maior potencial de produção do biossurfactante.

A produção de biossurfactante pelas sete cepas foi acompanhada por dois métodos indiretos amplamente utilizados na literatura (COOPER e GOLDENBERG, 1987; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; LIMA LOBATO *et al.*, 2002; NITSCHKE *et al.*, 2002; SANTA ANNA *et al.*, 2001, RAMNANI *et al.*, 2005): diminuição da tensão superficial do meio livre de células, após 48 horas de cultivo, e capacidade de emulsificar querosene, óleo de soja e n-hexadecano. Estes critérios foram utilizados para selecionar uma entre as sete cepas estudadas, através da comparação dos valores de tensão superficial e da capacidade emulsificante do biossurfactante produzido pelas diferentes culturas. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 9 e 10.

A Tabela 9 apresenta valores de tensão superficial do meio fermentado livre de células após 48 h fermentação do meio mineral contendo glicerina utilizando as diferentes cepas de *Bacillus sp.*

De acordo com a Tabela 9, as cepas de *Bacillus sp.*, cujo biossurfactante reduziu a tensão superficial do meio livre de células ($48,0 \pm 0,0 \text{ mN.m}^{-1}$), após 48 h de cultivo no *shaker*, foram LAMI002, LAMI005, LAMI008 e LAMI009. Por outro lado, os biossurfactantes produzidos pelas cepas LAMI003, LAMI007 e LAMI11 apresentaram o pior resultado, não havendo considerável redução da tensão superficial do meio fermentado livre de células. Portanto, dentre as sete estirpes bacterianas avaliadas, quatro foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio. Conforme citado por COOPER (1984), um microrganismo é considerado promissor se produz composto tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 40 dina.cm^{-1} . Contudo, um biossurfactante é considerado eficiente quando este valor for igual ou inferior a 35 dina.cm^{-1} . Segundo MULLIGAN (2005), para ser considerado um bom biossurfactante, a tensão da água deve ser baixada de 72 mN.m^{-1} para 35 mN.m^{-1} . De acordo com PINTO *et al.* (2009) o biossurfactante produzido por bactérias isoladas de locais contaminados com petróleo foi capaz de reduzir a tensão superficial para valores abaixo de 40 mN.m^{-1} .

Tabela 9 - Tensão superficial em meio fermentado livre de células de diferentes linhagens de *Bacillus sp.* não patogênicas, isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, cultivado em meio mineral suplementado com 2% (v / v) de glicerina como fonte de carbono após 48 horas de cultivo.

Cepas de <i>Bacillus sp.</i>	Tensão Superficial após 48 h (mN.m^{-1})			
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média
LAMI002	30,0±0,0	30,1±0,0	29,9±0,0	30,0±0,0
LAMI003	38,0±0,0	42,0±0,0	43,9±0,0	41,3±2,9
LAMI005	29,0±0,0	30,0±0,0	28,9±0,0	29,3±0,6
LAMI007	44,0±0,0	46,8±0,0	46,7±0,0	45,8±1,6
LAMI008	30,0±0,0	30,0±0,0	29,7±0,1	29,9±0,1
LAMI009	28,3±0,0	28,4±0,1	30,9±0,0	29,2±1,5
LAMI011	46,8±0,1	46,0±0,0	46,7±0,2	46,5±0,4

Considerando os dados da literatura citados anteriormente, podem-se definir as cepas LAMI002, LAMI005, LAMI008 e LAMI009 como potencialmente produtoras de agente tensoativo.

O caldo fermentado destas sete culturas microbianas também foi testado quanto à atividade emulsificante, como uma forma indireta de se atestar a produção de um biossurfactante. Sabe-se que uma das propriedades de interesse dos biossurfactantes é a sua capacidade de emulsificar líquidos não miscíveis formando emulsões estáveis (PORTER, 1994; DESAI & BANAT, 1997).

Os testes para avaliar a capacidade de emulsificação, que representa a quantidade de biossurfactantes necessária para manter a emulsão estável durante 24 h para o meio fermentado livre células, são também uma indicação da produção de biossurfactantes, realizado através do índice de emulsificação descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987), indicando resultado positivo para formação de emulsão. Foram utilizados óleo de soja, querosene e n-hexadecano (Tabela 10). *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 foram selecionados de acordo com a atividade emulsificante, em três fontes hidrofóbicas (óleo de soja, querosene e n-hexadecano) indicando como resultado positivo, e a menor redução da tensão superficial.

Tabela 10 - Avaliação da atividade de emulsificação (IE₂₄%) em óleo de soja, querosene e n-hexadecano dos produtos de fermentação das cepas de *Bacillus sp.* isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, cultivado em meio mineral suplementado com 2% (v / v) de glicerina como fonte de carbono após 48 horas de cultivo.

Cepas de <i>Bacillus sp.</i>	Índice de emulsificação		
	Óleo de soja	Querosene	N-hexadecano
LAMI002	Sim	Não	Sim
LAMI003	Sim	Não	Não
LAMI005	Sim	Sim	Sim
LAMI007	Sim	Não	Não
LAMI008	Sim	Sim	Não
LAMI009	Sim	Sim	Sim
LAMI011	Sim	Não	Não

Conforme observado nas Tabelas 9 e 10, as cepas de *Bacillus subtilis* que apresentaram potencial produtor de biossurfactante no meio estudado foram: LAMI005 e LAMI009, com maiores reduções da tensão superficial após 48 horas de cultivo e melhor capacidade emulsificante frente às três fontes hidrofóbicas testadas.

A Tabela 11 mostra os resultados de densidade óptica a 600 nm e o valor final do pH do meio de cultivo para as linhagens de *Bacillus sp.* avaliadas.

Observou-se que não houve grande variação do pH final do meio fermentado após 48 h de cultivo para todas as linhagens estudadas, permanecendo com um pH em torno de 7,0. Pode-se observar também (Tabela 11), um maior crescimento da biomassa para a cepa de *Bacillus* LAMI011 com $1,29 \pm 0,3$ nm, porém esta cepa não apresentou boas características produtoras de surfactantes.

Bacillus subtilis LAMI005, apresentou uma menor densidade óptica com $0,70 \pm 0,0$ nm, porém foi capaz de reduzir a tensão superficial a níveis significativos e apresentou boa capacidade emulsificante (Tabela 9, 10 e 11).

Tabela 11 - Densidade óptica e pH final do meio fermentado livre de células de diferentes linhagens de *Bacillus sp.* não patogênicas, isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, cultivado em meio mineral suplementado com 2% (v/v) de glicerina como fonte de carbono após 48 horas de cultivo.

Cepas de <i>Bacillus sp</i>	Densidade óptica (600 nm)	pH final
LAMI002	$0,73 \pm 0,0$	$6,91 \pm 0,0$
LAMI003	$0,73 \pm 0,0$	$6,92 \pm 0,0$
LAMI005	$0,70 \pm 0,0$	$6,91 \pm 0,0$
LAMI007	$1,10 \pm 0,0$	$6,75 \pm 0,2$
LAMI008	$0,71 \pm 0,0$	$6,91 \pm 0,0$
LAMI009	$0,92 \pm 0,2$	$6,82 \pm 0,0$
LAMI011	$1,29 \pm 0,3$	$6,77 \pm 0,0$

Portanto, as linhagens LAMI005 e LAMI009 foram avaliadas posteriormente, uma vez que apresentaram resultados positivos no tocante à produção de biossurfactantes,

avaliada através da redução da tensão superficial e / ou da capacidade de emulsionar as diferentes fontes de hidrocarbonetos.

A Figura 14 apresenta a atividade emulsificante do biossurfactante produzido pelas cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 frente a óleo de soja, querosene e n-hexadecano, respectivamente. Deve-se destacar o potencial destas cepas uma vez que o biossurfactante produzido promoveu a emulsificação dos três hidrocarbonetos testados, bem como promoveu a redução da tensão superficial do meio fermentado livre de células, $29,3 \pm 0,6$ e $29,2 \pm 1,5$ mN.m^{-1} , respectivamente. As cepas LAMI002 e LAMI008 promoveram redução da tensão superficial do meio livre de célula, atingindo $30,0 \pm 0,0$ e $29,9 \pm 0,1$ mN.m^{-1} , porém o biossurfactante produzido não foi capaz de emulsificar querosene e n-hexadecano, respectivamente.

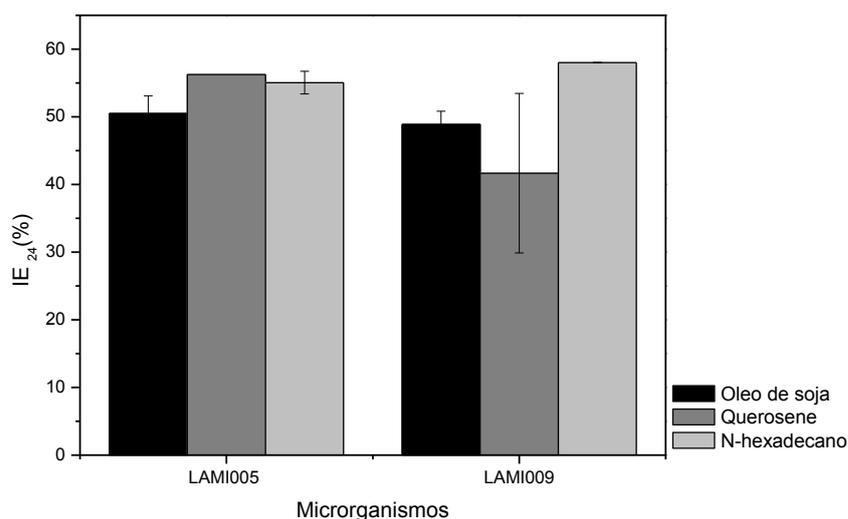


Figura 14 - Emulsificação ($IE_{24}\%$) de óleo de soja, querosene e n-hexadecano em 48 h de fermentação pelas cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, respectivamente. Barras de erros representam o desvio padrão.

4.4 - Produção de Biossurfactante em *Shaker* por *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 selecionadas a partir do *Screening*

4.4.1 - Avaliação do Crescimento Microbiano, Consumo de Substrato, Produção de Surfactina

Foram realizados ensaios em triplicata para a produção de biossurfactantes pelas cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 em mesa agitadora, que foram selecionadas através do *screening*. Além disso, amostras foram coletadas ao longo dos tempos de fermentação (0h, 8h, 24h, 48h e 72h) para a determinação da concentração celular, a atividade emulsificante de diferentes fontes hidrofóbicas (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985), a redução da tensão superficial, o índice de emulsificação (COOPER e GOLDENBERG, 1987), a concentração de surfactina, a concentração do substrato e a concentração micelar crítica.

As Figuras 15 A e B mostram os resultados de crescimento celular, consumo do substrato e da produção de surfactina em função do tempo para os dois microrganismos selecionados *Bacillus subtilis* (LAMI005 e LAMI009), respectivamente. Entre as duas cepas selecionadas, o microrganismo que apresentou maior crescimento celular foi o *Bacillus subtilis* LAMI009, principalmente às 48 horas de cultivo. Também foi observado que após 48 horas de fermentação, o crescimento celular diminuiu para ambos os microrganismos, determinando uma fase estacionária de crescimento.

A maioria dos biossurfactantes é geralmente produzida quando as culturas atingem a fase estacionária de crescimento. No entanto, algumas espécies podem ter pequena produção durante a fase exponencial de crescimento celular (RON *et al.*, 2001). Exemplos desses perfis são mostrados na Figura 15, onde o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* LAMI005 foi sintetizado em maior quantidade durante a fase estacionária de crescimento celular. Na Figura 15 B para o *B. subtilis* LAMI009, a síntese de biossurfactante findou no início da fase estacionária, após 48 horas de fermentação a formação do produto passa a ser quase constante, alcançando uma concentração máxima em 72 horas de cultivo aliada à intensa redução do substrato que é consumido quase que completamente. Após 20 horas de fermentação ocorreu uma queda brusca no consumo do substrato. Entre 16 e 36 horas de fermentação o microrganismo utilizou preferencialmente o substrato para crescimento celular e formação do produto, que será melhor discutida na seção 4.6.1 com os gráficos de μ_x e μ_p . Segundo FONTES *et al.* (2008), a produção de biossurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, durante a fase estacionária do crescimento da biomassa.

A produção de surfactina durante 48 h de fermentação por *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, apresentou valores de concentração de 258,11 mg. L⁻¹ e 231,96 mg. L⁻¹, respectivamente. No entanto, a produção de surfactina foi maior em 72 h de fermentação,

com valores de concentração de 441,06 mg. L⁻¹ e 267,56 mg. L⁻¹, respectivamente. GIRO *et al* (2009) alcançaram uma concentração de surfactina máxima de 232 mg. L⁻¹ em 48 h, que se manteve constante até 72 h, utilizando meio mineral suplementado com glicose e frutose. DAVIS (1999) observou um aumento na concentração de surfactina durante a fase estacionária, que atingiu um máximo de 439 mg.L⁻¹, utilizando a glicose como fonte de carbono adicionada ao meio mineral testado, após 48 h de fermentação. NEVES *et al.* (2007) obtiveram uma produção de biossurfactante por *B. atrophaeus* ATCC 9372 de 346,0 mg.L⁻¹ detectada no final da fase de crescimento exponencial, usando 2,5 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de caseína em meio mineral de cultivo. Comparado a estes resultados de literatura, a fermentação por *Bacillus subtilis* LAMI005 para a produção de surfactina a partir de glicerol foi mais eficiente, uma vez que maiores concentrações foram alcançadas.

Como pode ser observado na Figura 15 (A, B), verificou-se uma fase exponencial entre 4 e 20 horas para *Bacillus subtilis* LAMI005 e entre 16 a 36 horas de cultivo para *Bacillus subtilis* LAMI009. Nesta fase, a taxa específica de crescimento é máxima, que será melhor discutida na seção 4.6.1. Pode-se observar também, que *Bacillus subtilis* LAMI009 consumiu uma maior concentração do substrato (em torno de 97 %) comparado com o *Bacillus subtilis* LAMI005, que consumiu 53 % do substrato, no tempo de fermentação que foi padronizado entre 0 a 72 horas de cultivo. Segundo SCHMIDELL *et al.* (2001), nem sempre o substrato se esgota completamente quando a concentração celular é máxima, podendo ainda existir uma concentração residual daquela substância no meio de cultura, ao término da fermentação.

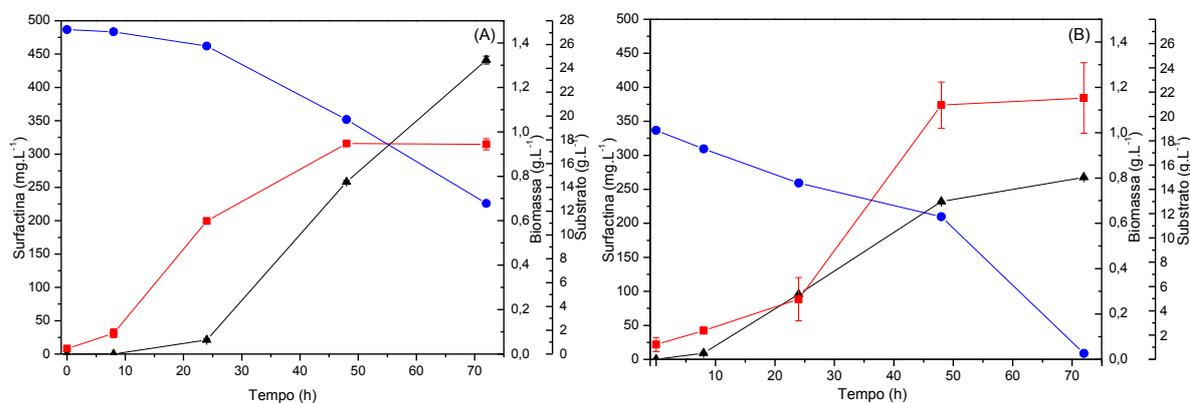


Figura 15 - Perfil de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo do substrato para ensaios realizados em *shaker* utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 a 30°C e 180 rpm. (A) LAMI005 e (B) LAMI009. (●) Substrato; (■) Biomassa; (▲) Surfactina.

4.4.2 - Avaliação do pH

COOPER *et al.* (1981) relataram que a acidificação a pH 2,0 da solução contendo biossurfactante de *Bacillus subtilis* eleva a tensão superficial para 62 mN/m. O fato de o valor de tensão superficial voltar a 27 mN/m com a neutralização, em pH igual a 6, mostra a dependência das propriedades surfactantes da surfactina em relação ao pH. Pode-se concluir que em meio ácido este comportamento ocorre, pois a surfactina precipita sem, contudo, ter sua estrutura alterada (COOPER *et al.*, 1981; COSTA, 2005).

A Figura 16 apresenta o comportamento do pH durante o ensaio fermentativo em função do tempo. O pH do meio manteve-se em torno de 7,0. O meio fermentado não chegou a faixas extremas de acidez, portanto não houve precipitação da surfactina. Para o cultivo com o *Bacillus subtilis* LAMI005 o pH foi reduzido após 8 horas de fermentação para uma faixa de 6,80, no entanto, para o cultivo com o *Bacillus subtilis* LAMI009 o pH foi reduzido após 24 horas de fermentação para uma faixa de 6,85, não houve variação significativa no pH do meio para os dois microrganismos testados. Quando é comparado o comportamento da variação do pH frente aos valores da tensão superficial, observou-se que a redução da tensão acompanha o mesmo perfil do gráfico da variação do pH (Figura 17).

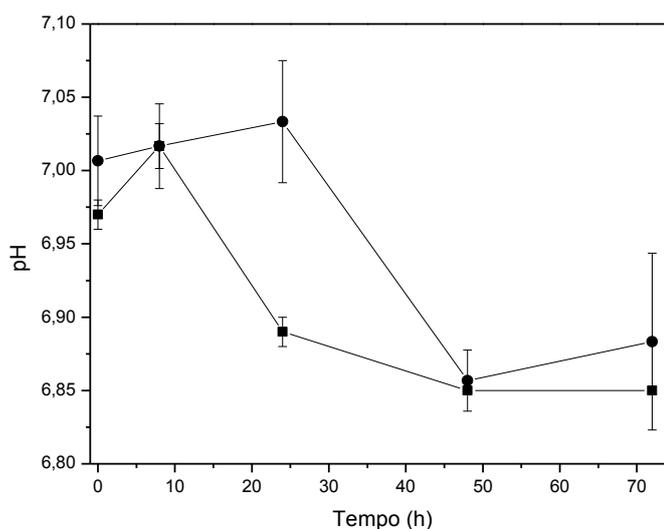


Figura 16 - Comportamento do pH em função do tempo para as cepas de *Bacillus subtilis* (■) LAMI005 e (●) LAMI009, realizado em *shaker* a 180 rpm, 30°C por 72 horas.

4.4.3 - Avaliação da Atividade Superficial do Meio de Cultivo Livre de Células

Na Figura 17, observa-se que a tensão superficial, sendo uma medida indireta para a produção de biossurfactante, diminuiu com o aumento da concentração de surfactina no meio fermentado livre de células. Após 48 horas de cultivo, a tensão superficial manteve-se numa faixa estável de $28,8 \pm 0,05 \text{ mN.m}^{-1}$ para a cepa LAMI005 e de $27,1 \pm 1,13 \text{ mN.m}^{-1}$ para a cepa LAMI009, sem nenhuma redução posterior para os dois microrganismos analisados. Como explicação, sabe-se que mesmo na presença de uma pequena concentração de biossurfactantes, a concentração micelar crítica pode ter sido alcançada, a partir da qual, qualquer variação na tensão superficial não pode ser observada (LIMA LOBATO *et al.*, 2002, FERRAZ *et al.*, 2002).

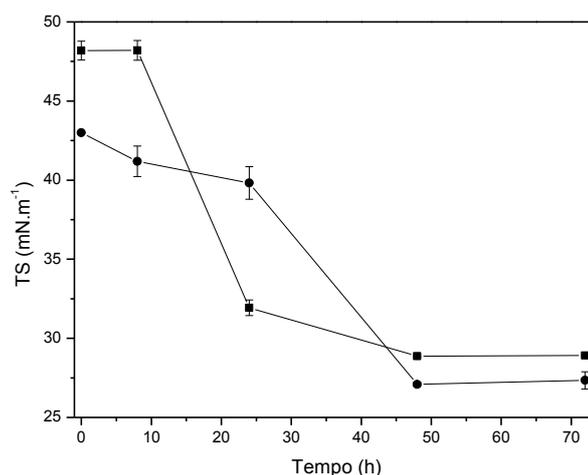


Figura 17 - Redução da tensão superficial em função do tempo para o ensaio realizado em *shaker* a 180 rpm, 30°C por 72 horas, com os *Bacillus subtilis* (■) LAMI005 e (●) LAMI009.

Os biossurfactantes produzidos pelas cepas de *B. subtilis* LAMI005 e LAMI009 apresentaram maior redução da tensão superficial do meio de cultivo livre de células, comparado com o biossurfactante produzido pela cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 utilizada neste estudo, que apresentou um menor valor da tensão superficial de $31,5 \pm 1,6 \text{ mN.m}^{-1}$ após 72 h de fermentação.

4.4.4 - Avaliação das Propriedades Emulsionantes do Meio de Cultivo Livre de Células

A capacidade do biossurfactante em formar emulsões de óleo-água, pode ser determinada pela atividade emulsificante. Com este método, a turbidez promovida pela fase de dispersão de óleo em uma fase líquida, é determinada através de uma medida de absorvância a 540 nm (SOUSA, 2008). Uma unidade de atividade emulsificante foi definida como a quantidade de biossurfactante que mudou a absorvância da fase aquosa a 540 nm (A_{540}) por 1,0 (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985). A Figura 18 mostra os resultados da avaliação da estabilidade do meio de cultivo livre de células produzido pelo *B. subtilis* LAMI005 e do meio de cultivo livre de células produzido pelo *B. subtilis* LAMI009. Verificou-se que houve uma manutenção da emulsão formada pelo biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* LAMI005, enquanto que biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* LAMI009 não apresentou uma emulsão estável com o tempo de análise (50 minutos). Maiores valores de atividade emulsificante foram obtidos com um substrato de origem vegetal (óleo de soja), demonstrando uma boa afinidade para a formação de emulsão. Observa-se que os biossurfactantes aqui produzidos não apresentaram boa afinidade para a formação de emulsão com o N-hexadecano, apresentando baixos valores de unidades de atividade emulsificante. Verificou-se que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI009 apresentou uma alta atividade emulsificante nos primeiros 10 minutos de análise, com um valor de 2,16 unidades com óleo de soja, porém a emulsão formada não permaneceu estável com o tempo. O biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005, no entanto, apresentou menor atividade emulsificante nos primeiros 10 minutos, com um valor de 1,77 unidades com óleo de soja, mas apresentou uma maior estabilidade da emulsão formada com o tempo, mostrando uma boa afinidade para estabilizar emulsões. Nesta, pode ser observado que quanto maior a densidade óptica maior é a atividade emulsificante.

BARBOSA (2007) alcançou 1,108 unidades de atividade emulsificante com n-hexadecano para produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como fonte de carbono óleo de pequi. CIRIGLIANO e CARMAN (1985) obtiveram 0,98 unidades de atividade emulsificante com n-hexadecano, produzindo liposan a partir de óleo de soja em meio YNB utilizando *Candida lipolytica*. Em nossos experimentos, resultados superiores foram obtidos com n-hexadecano e o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005, apresentando 1,12 unidades de atividade emulsificante.

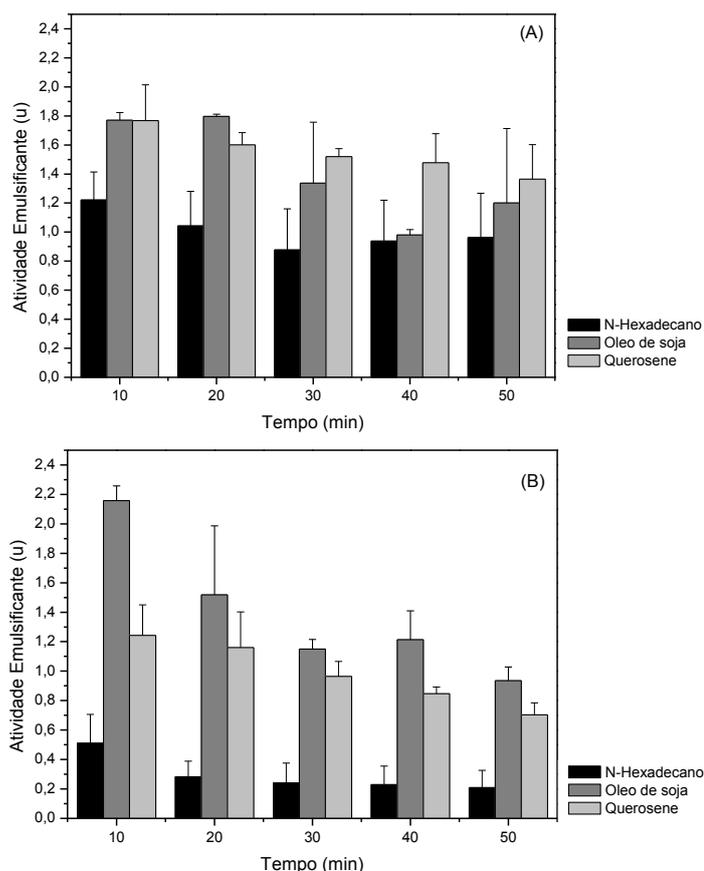


Figura 18 - Atividade emulsificante (unidades) do meio de cultivo produzido em 48 h de cultivo por *Bacillus subtilis* (A) LAMI005 e (B) LAMI009 frente a diferentes substratos: a N-hexadecano, óleo de soja e querosene. Barras de erros representam o desvio padrão.

Além da atividade emulsificante, também se avaliou o índice de emulsificação. O estudo da emulsificação foi realizado utilizando o sobrenadante livre de células do cultivo com os *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, no tempo de 48 h de fermentação. Foram avaliados os hidrocarbonetos querosene e óleo de soja. Verificou-se que os dois hidrocarbonetos foram emulsificados pelo biossurfactante, porém o biossurfactante apresentou maior afinidade por óleo de soja, uma vez que se observou uma emulsão maior e mais estável (Tabela 12).

Tabela 12 - Índice de emulsificação E_{24} (%) do caldo fermentado por 48 h em diferentes fontes hidrofóbicas utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, em meio mineral suplementado de glicerol realizado em *shaker* a 30°C e 180 rpm.

Microrganismo	Hidrocarbonetos avaliados	
	Querosene	Óleo de soja
LAMI005	32,2 ± 5,0	40 ± 0,0
LAMI009	32,2 ± 3,8	39,9 ± 3,3

4.4.5 - Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica (CMC) é um importante parâmetro, que indica a mínima concentração necessária de biossurfactante para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quanto menor a CMC mais eficiente o biossurfactante (MEIRA, 2007). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (MULLIGAN, 2005; PIRÔLLO, 2006; RUFINO, 2006). A CMC é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante podendo ser definida, também, como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa (RUFINO, 2006).

A Figura 19 apresenta os resultados de tensão superficial após diluição sucessiva do meio fermentado livre células, após 48 h de fermentação, contendo surfactina. A cepa de *Bacillus subtilis* LAMI005, produziu um biossurfactante que reduziu a tensão superficial para 28,9 mN/m, com CMC de 19,85 mg.L⁻¹, enquanto que a cepa de *Bacillus subtilis* LAMI009 que reduziu a tensão superficial para 27,3 mN/m, com CMC de 39,99 mg.L⁻¹.

Segundo CHRISTOFI & IVSHINA (2002), quanto mais baixa a CMC melhor é o surfactante; a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* apresenta uma CMC de 23 mg.L⁻¹ sendo considerada um ótimo biossurfactante. BUENO *et al.* (2010) obtiveram valores de CMC de 27 mg.L⁻¹ quando o biossurfactante foi produzido a partir do meio de sacarose e 37 mg.L⁻¹, quando produzido a partir de caldo de cana, utilizando a bactéria *Bacillus pumilus*. FOX & BALA (2000) utilizaram resíduos de batata como substrato para a cepa *B. subtilis* ATCC 21332, produzindo um biossurfactante que reduzia a tensão superficial para 30 mN/m com uma CMC de 150 mg.L⁻¹. O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 testado neste estudo apresentou uma concentração micelar crítica 33,6 mg.L⁻¹. Melhores resultados foram obtidos utilizando a cepa de *Bacillus subtilis* LAMI005, indicando maior eficiência com respeito à concentração micelar crítica, atingindo valores de CMC de 19,85 mg.L⁻¹, determinando um bom surfactante. Segundo OBERBREMER *et al.* (1990), os surfactantes eficientes apresentam uma CMC baixa, pois a concentração de surfactante necessária para reduzir a tensão superficial ao máximo é menor.

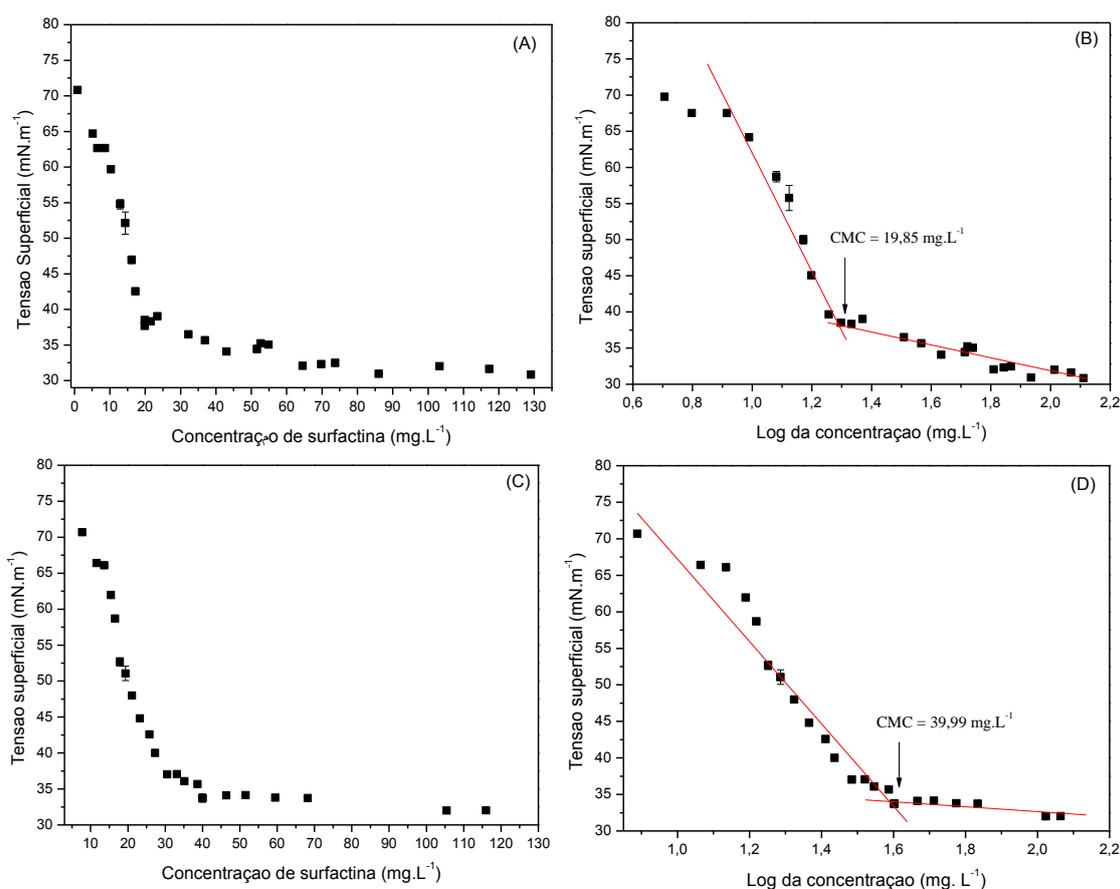


Figura 19 - Influência da concentração de surfactina na tensão superficial do caldo fermentado livre de células. (A) e (C) Tensão superficial pela concentração de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, respectivamente, após 48 horas de fermentação a 30 ° C e 180 rpm. (B) e (D) Tensão superficial em função do logaritmo da concentração de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, respectivamente.

4.5 - Produção de Biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 em Biorreator

4.5.1 - Influência da Concentração do Inóculo na Produção de Biossurfactante em Biorreator

Fundamentados nos resultados obtidos em frascos agitados, foram testadas as condições de fermentação em *shaker* no biorreator de 4 L. Utilizou-se a cepa de *Bacillus subtilis* LAMI005 por ter apresentado melhores resultados na produção de surfactina. A fermentação foi realizada com concentração de 1% (v/v) de inóculo, a mesma utilizada em *shaker*, conduzido em reator de 4 L de volume, com 3 L de meio mineral (MM1)

suplementado com 2 % (v/v) de glicerol, agitação de 200 rpm, aeração de 1 L.min⁻¹ a 30°C. Neste ensaio, foram acompanhados os valores da concentração celular, do oxigênio dissolvido e da redução da tensão superficial por 52 h de cultivo. A Figura 20 apresenta os resultados da concentração celular e do oxigênio dissolvido com o tempo de fermentação. Pode-se concluir, de acordo com os resultados, que a concentração de 1% de inóculo não foi capaz de favorecer o crescimento celular em biorreator. Por conta disto, não houve redução do oxigênio dissolvido e nem formação do produto.

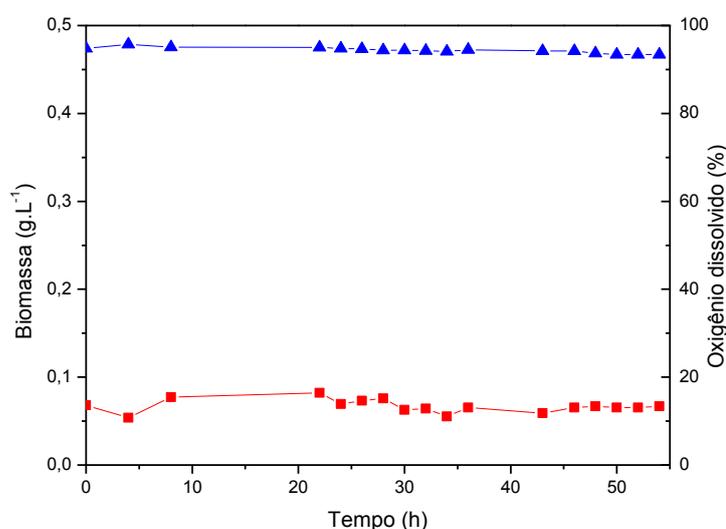


Figura 20 - Perfil da biomassa e do oxigênio dissolvido em função do tempo durante a fermentação em biorreator a 30°C, 200 rpm e aeração de 1 L.min⁻¹, utilizando *B. subtilis* LAMI005, com concentração de 1% de inóculo. (■) Biomassa (g.L⁻¹); (▲) oxigênio dissolvido.

A Tabela 13 apresenta os resultados das tensões superficiais obtidas após 52 horas de cultivo no biorreator, utilizando a concentração de 1% (v/v) de inóculo. Pode-se observar que a menor tensão superficial foi de 38,1±0,3 mN.m⁻¹ em 24 horas de cultivo, enquanto que na fermentação em *shaker* foi observado uma redução para 28,8 ± 0,05 mN.m⁻¹ (Figura 17). Esperava-se que houvesse a produção de biossurfactante em ensaio conduzido no fermentador, utilizando as mesmas condições realizadas em mesa agitadora. No entanto, não se obteve crescimento celular, nem uma diminuição significativa da tensão superficial do meio de cultivo no ensaio conduzido no biorreator.

MEIRA (2007) obteve resultados semelhantes, ao comparar os perfis de crescimento de *P. aeruginosa* obtidos em Erlenmeyers e em biorreator para produção de biossurfactantes, relatou que o crescimento no biorreator foi muito menor. ROCHA (2007) em estudo cinético da produção de biossurfactantes, também relatou que baseado nos

resultados obtidos em frascos agitados esperava-se que houvesse a produção de biossurfactantes, em ensaio conduzido no fermentador, mas não houve diminuição da tensão superficial.

Tabela 13 - Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005, em biorreator 4 L de volume útil a 30°C, 200 rpm e aeração de 1 L.min⁻¹, utilizando 1% (v/v) de inóculo.

Tempo de fermentação (h)	Média da Tensão superficial (mN.m ⁻¹)
0	52,3 ±0,43
8	45,5±1,3
24	38,1±0,3
30	41,5±0,5
34	45,6±0,6
46	41,8±0,8
48	42,0±0,5
52	41,6±0,8

Baseado neste resultado, nos ensaios seguintes em biorreator, a concentração de inóculo utilizada passou a ser de 10% (v/v) em meio mineral.

Realizou-se um ensaio em biorreator com 10% de inóculo (MM1) em 3 L de meio de cultivo (MM1), o mesmo utilizado em *shaker*, suplementado com 2 % (v/v) de glicerol e 0,1 % (v/v) de solução de micronutrientes, a uma agitação de 200 rpm, aeração de 1 L.min⁻¹ a 30°C. O experimento foi realizado utilizando a cepa *Bacillus subtilis* LAMI005. Neste ensaio foram acompanhados os perfis mostrados nas Figuras 21 e 22: concentração celular, concentração de surfactina, consumo do substrato, avaliação do oxigênio dissolvido e da redução da tensão superficial por 72 h de cultivo.

Com o aumento da concentração do inóculo, ocorreu crescimento celular (3,39 g.L⁻¹) após 70 horas de cultivo, coincidindo com uma redução na concentração de glicerol de aproximadamente 53%, porém não houve uma significativa produção de biossurfactante, obtendo-se um máximo de 51,1 ± 2,0 mg.L⁻¹ em 54 horas de fermentação.

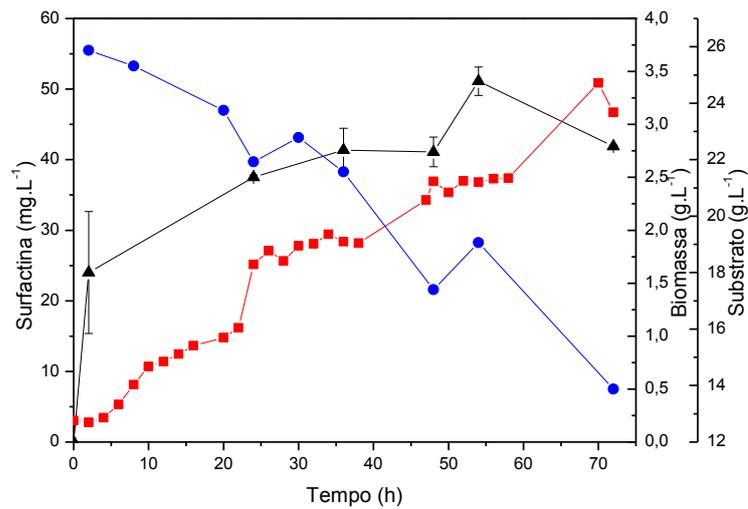


Figura 21 - Perfil de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo do substrato para o ensaio com 10% de inóculo em meio de cultivo (MM1), o mesmo utilizado em *shaker*, realizado em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 a 30°C, 200 rpm e 1 L.min⁻¹. (●) Substrato; (■) Biomassa; (▲) Surfactina.

Apesar da pouca produção de surfactina, a concentração obtida foi suficiente para reduzir a tensão superficial do meio fermentado livre de células de $43,9 \pm 0,1 \text{ mN.m}^{-1}$ para $31,8 \pm 0,3 \text{ mN.m}^{-1}$ após 72 horas de cultivo.

A redução da tensão superficial coincide com a brusca queda do oxigênio dissolvido no meio fermentado e com a multiplicação celular, com 8 horas de fermentação verificou-se uma taxa de 1,1% de oxigênio dissolvido (Figura 22), ou seja, ocorreu um intenso crescimento celular, mas não houve uma considerável produção do metabólito de interesse.

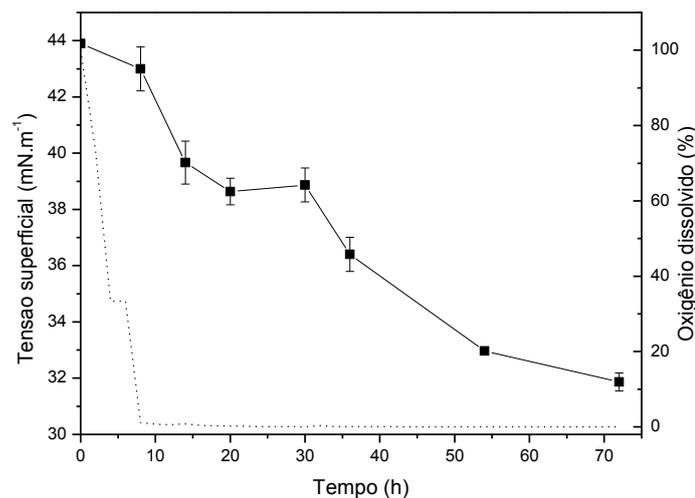


Figura 22 - Perfil da tensão superficial e do oxigênio dissolvido para o ensaio com 10% de inóculo em meio de cultivo (MM1), o mesmo utilizado em *shaker*, realizado em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 a 30°C, 200 rpm e 1 L.min⁻¹. (■) Tensão superficial; (...) Oxigênio dissolvido.

4.5.2 - Influência da Adição de Extrato de levedura no Crescimento Celular por *B. subtilis* LAMI005

A produção de surfactina foi realizada em biorreator contendo 3 L de meio mineral (MM2) suplementado com glicerina e solução de micronutrientes. A influência da adição de extrato de levedura ao meio de propagação do inóculo para a produção de biosurfactante foi analisada. Foi utilizado para inóculo o meio mineral (MM2) suplementado com extrato de levedura ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) e glicerol como fonte de carbono. Outro ensaio foi realizado com o meio de inóculo (MM2) sem extrato de levedura. As fermentações foram conduzidas com 10% (v/v) de inóculo, que foi adicionado ao meio mineral (MM2) no biorreator. Todas as fermentações foram conduzidas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm e aeração de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Figura 23 apresenta o perfil do crescimento celular, oxigênio dissolvido e redução da concentração do ferro para os ensaios com 10% de inóculo em meio mineral contendo extrato de levedura e sem adição de extrato de levedura, realizado em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005.

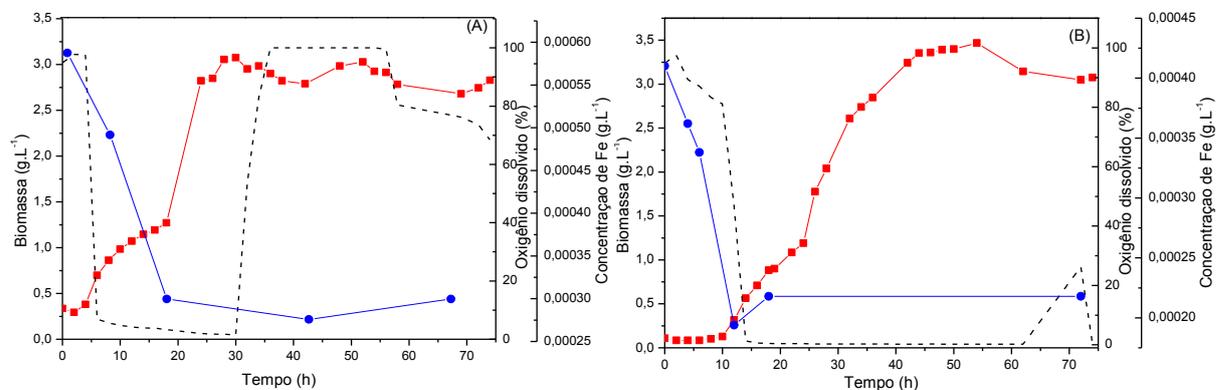


Figura 23 - Perfil de crescimento celular, oxigênio dissolvido e redução da concentração do ferro para os ensaios com 10% de inóculo em meio mineral contendo extrato de levedura (A) e sem adição de extrato de levedura (B), realizado em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 a 30°C , 200 rpm e $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. (■) Biomassa, (---) oxigênio dissolvido (●) concentração de ferro.

Observou-se uma fase de adaptação celular de aproximadamente 2 h de cultivo, um máximo na concentração celular de $3,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 30 horas de cultivo em biorreator, seguindo de uma fase estacionária de crescimento celular (fim da fase exponencial) de 26

horas de cultivo, para a cepa cultivada em meio de propagação de inóculo com adição de extrato de levedura.

A fermentação com a cepa cultivada em meio de propagação de inóculo sem adição de extrato de levedura apresentou uma fase lag de aproximadamente 6 horas de cultivo. Verificou-se na Figura 23 B que a cultura atingiu a fase estacionária após 34 horas de cultivo, com uma concentração máxima de $3,47 \text{ g.L}^{-1}$ em 54 horas, observando-se uma redução do oxigênio dissolvido no meio, na fase exponencial de crescimento, quando ocorre uma queda brusca no oxigênio chegado a níveis de 0%.

A quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por diversos microrganismos são influenciados tanto pela fonte de carbono quanto pelas concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro no meio, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995). Foi determinada, neste estudo, a concentração inicial e final de ferro durante o cultivo de *Bacillus subtilis* LAMI005 em biorreator para produção de biossurfactante. Na Figura 23, pode-se observar que houve um consumo do ferro em ambas as fermentações analisadas, ocorrendo uma pequena variação entre elas. A figura indica uma redução máxima do ferro na fase exponencial do crescimento celular, enquanto que na fase estacionária não houve consumo do ferro. Portanto, observou-se que o microrganismo utilizou o ferro para seu metabolismo.

WEI & CHU (1998), relataram que além dos efeitos do ferro no metabolismo celular, foi demonstrado que a adição de sais de ferro no meio de cultivo de *Bacillus subtilis*, aumentou significativamente, a produção do surfactante surfactina. SANTOS (2004) afirmou que a adição de ferro induziu uma redução da tensão superficial do meio para $26,2 \text{ dina. cm}^{-1}$, sendo este valor um dos menores já reportados para biossurfactantes, somente comparado a surfactina produzida por *B. subtilis*. WEI *et al.* (2003) identificaram que a adição de ferro em quantidade apropriada ao cultivo de *B. subtilis* 21332 melhorou significativamente a produção de surfactina.

4.5.3 - Avaliação da Influência da Adição de Extrato de levedura na Produção de Biossurfactante

As amostras foram coletadas ao longo dos tempos de fermentação determinados. A redução tensão superficial, a atividade emulsificante em diferentes fontes hidrofóbicas, o índice de emulsificação, a concentração de surfactina e consumo de glicerol foram os parâmetros utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante.

A Figura 24 apresenta a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 em MM2 suplementado com 20 g.L⁻¹ (v/v) da fonte de carbono (glicerol) e 0,1% (v/v) da solução de micronutrientes. A concentração de surfactina atingiu um valor máximo de 115,89 mg.L⁻¹ em 54 h de fermentação e de 263,64 mg.L⁻¹ em 30 h de fermentação em meio com extrato de levedura e meio sem extrato de levedura, respectivamente. Observou-se uma queda da formação do produto após 72 horas para ambas as fermentações.

CASAS e OCHOA (1999), obtiveram resultados parecidos, quando avaliaram diferentes concentrações de extrato de levedura (1 a 20 g.L⁻¹), para otimizar a produção de biossurfactante e constataram que em baixas concentrações de extrato de levedura (1 g.L⁻¹) a produção de soforolípídeos produzido por *Candida bombicola* era favorecida.

Com relação ao consumo do glicerol, houve um maior consumo do substrato (cerca de 96%) pela cepa cultivada em meio de propagação de inóculo com adição de extrato de levedura, ou seja, o microrganismo consumiu mais a fonte de carbono, porém com menor produção de surfactina. Por outro lado, a cepa cultivada em meio de propagação de inóculo sem extrato de levedura consumiu apenas 40% do glicerol inicial, mas atingiu uma maior concentração de biossurfactante.

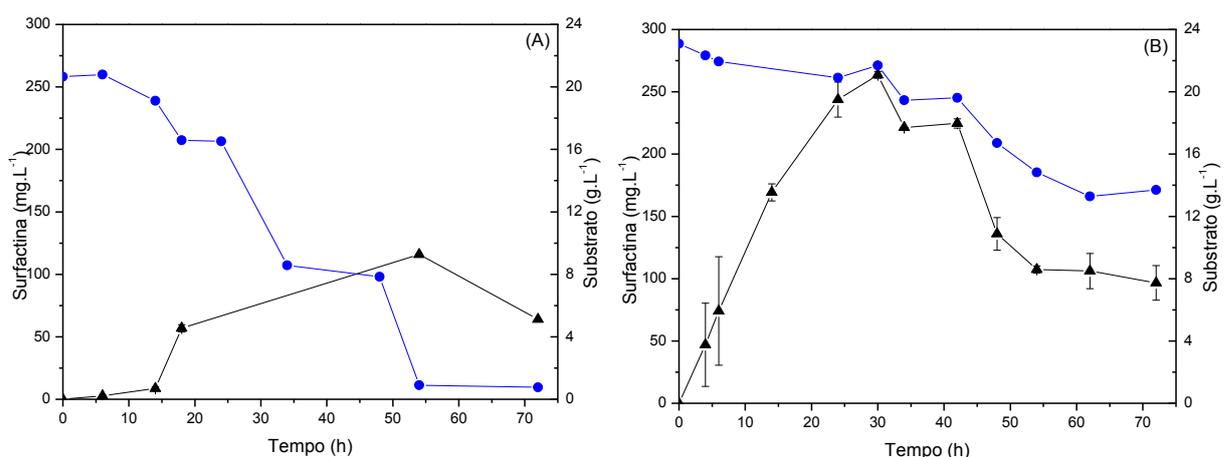


Figura 24 - Concentração de surfactina e consumo de substrato por *B. subtilis* LAMI005 em biorreator, a 30 °C, 200 rpm e com uma taxa de aeração de 1,0 L.min⁻¹. (●) consumo de substrato e (▲) formação de produto (surfactina). (A) cepa cultivadas em meio de inóculo suplementado com extrato de levedura; (B) cepa cultivada em meio de inóculo sem extrato de levedura.

A produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 em biorreator também foi avaliada, indiretamente, através da redução da tensão superficial e da capacidade emulsificante. Como pode ser visto na Figura 25, a cepa cultivada em meio de inóculo sem extrato de levedura produziu um biossurfactante que se mostrou mais eficiente na redução da tensão superficial de $39,33 \pm 0,57 \text{ mN.m}^{-1}$ para $28,97 \pm 0,06 \text{ mN.m}^{-1}$, do que o biossurfactante extraído da fermentação em meio para inóculo com extrato de levedura, que apresentou uma redução de $48,3 \pm 0,26 \text{ mN.m}^{-1}$ para $40,0 \pm 0,00 \text{ mN.m}^{-1}$. Resultados semelhantes foram reportados na literatura, quando FOX e BALA (2000) verificaram que a adição de extrato de levedura em meio alternativo, estimulou o crescimento da cepa *B. subtilis*, porém não favoreceu o decréscimo na tensão superficial. REIS *et al.* (2004) avaliaram a influência de extrato de levedura, na produção de surfactantes lipopeptídeos por *B. subtilis* em material de baixo custo, obtendo maior biomassa no ensaio com extrato de levedura, no entanto, não se observou a influência na produção de biossurfactante, acompanhada através da redução na tensão superficial. Entretanto, ROCHA (2007) avaliou a influência do extrato de levedura na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI007 usando meio mineral formulado com suco de caju clarificado, obteve resultados positivos com adição de extrato de levedura e verificou uma menor tensão superficial no meio quando houve suplementação com extrato de levedura.

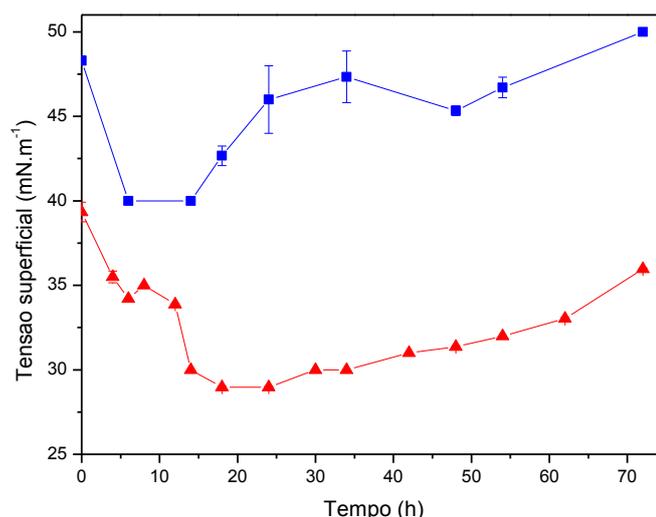


Figura 25 - Produção de biossurfactante avaliada pela tensão superficial por *B. subtilis* LAMI005 em biorreator, a 30°C , 200 rpm e com uma taxa de aeração de $1,0 \text{ L.min}^{-1}$. (■) Cepa cultivada em inóculo com extrato de levedura; (▲) cepa cultivada em inóculo sem extrato de levedura.

Avaliou-se ainda a atividade emulsificante do produto de fermentação dos ensaios com e sem suplementação de extrato de levedura no meio de inóculo. Com este método, a turbidez promovida pela fase de dispersão de óleo em uma fase líquida é determinada através de uma medida de absorbância a 540 nm. Resultados da atividade de emulsificação para emulsões formadas em querosene, óleo de soja e n-hexadecano, estão apresentadas na Figura 26.

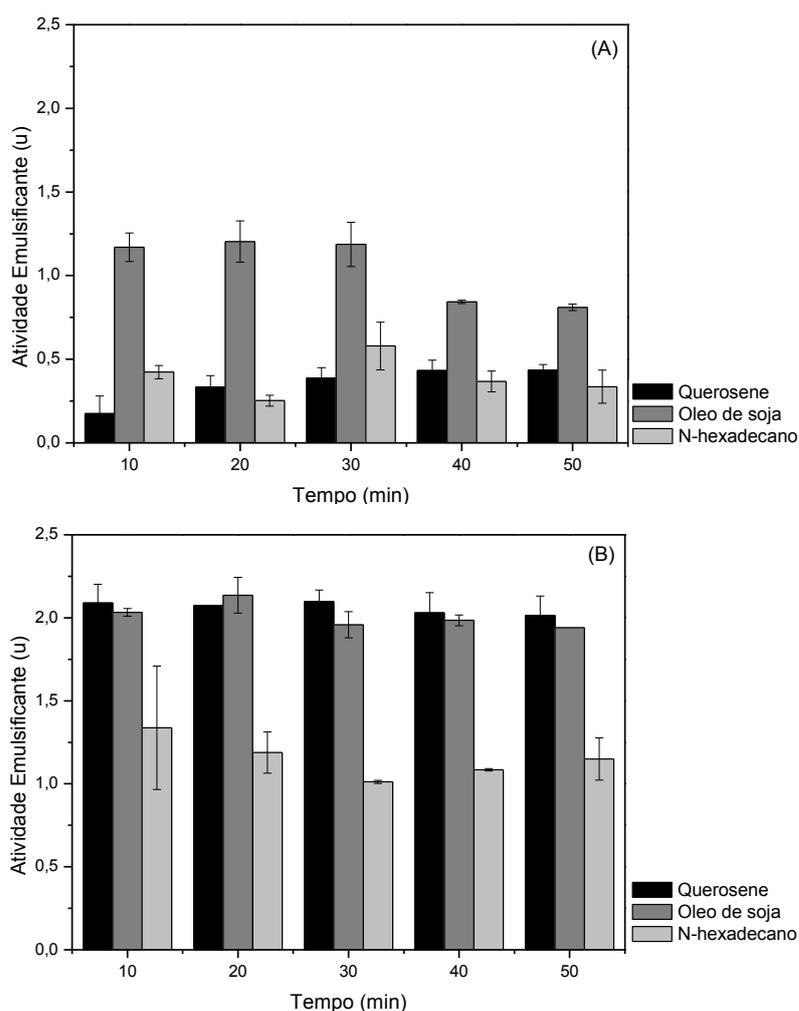


Figura 26 - Atividade emulsificante (unidades) do meio de cultivo produzido em biorreator por cultivo com *Bacillus subtilis* LAMI005, frente a diferentes substratos: a N-hexadecano, óleo de soja e querosene. (A) cepa cultivadas em meio de inóculo suplementado com extrato de levedura; (B) cepa cultivadas em meio de inóculo sem extrato de levedura. Barras de erros representam o desvio padrão.

O biossurfactante produzido pela cepa cultivada em meio sem suplementação de extrato de levedura apresentou melhores resultados de atividade emulsificante. A maior atividade de emulsificação foi obtida com querosene (2,09 u), que não apresentou bons resultados de índice de emulsificação com esta fonte hidrofóbica. A segunda maior atividade

emulsificante foi obtida em óleo de soja (2,03 u), alcançando um índice de emulsificação de 48 % na amostra correspondente a 34 horas de cultivo. O n-hexadecano apresentou valores de atividade (1,38 u), com resultados máximos do índice de emulsificação (50 %) na amostra correspondente a 34 horas de cultivo (Figura 26 B). O biossurfactante produzido pela cepa cultivada em meio suplementado com extrato de levedura também apresentou atividade emulsificante, porém foi menos estável (Figura 26 A).

Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou meio mineral sem suplementação de extrato de levedura ao meio para inóculo, confirmando o que alguns autores já haviam estudado (CASAS e OCHOA, 1999, FOX e BALA, 2000, REIS *et al.*, 2004), quando não se observou a influência do extrato de levedura na produção de biossurfactante.

Apesar de ter ocorrido uma produção significativa de biossurfactante em biorreator, quando comparados aos valores reportados na literatura, chegando a uma produção de até 263,64 mg.L⁻¹, não foi observado o mesmo perfil de produção de surfactina ocorrido em *shaker*. Resultados semelhantes foram obtidos por alguns autores (MEIRA, 2007; CAMILIOS NETO, 2010). Isto pode ser explicado pelo fato de que durante a fermentação em *shaker*, alguns parâmetros como a taxa de transferência do oxigênio dissolvido e a manutenção do pH, dificilmente podem ser monitorados e por isso não se sabe qual foi a aeração utilizada nas fermentações conduzidas no *shaker*. Quando se realiza a fermentação em biorreatores, a possibilidade de monitorar estes parâmetros contribui para a otimização do processo (MEIRA, 2007), é necessário analisar uma variação de aeração em biorreator para aperfeiçoar a produção do biossurfactante.

As faixas de aeração (1 L.min⁻¹) e de agitação (200 rpm) que foram utilizadas durante os cultivos em biorreator podem ter influenciado para a baixa produção da surfactina. Desta forma, é importante que sejam avaliados novas faixas de aeração, como exemplo 0,5 L.min⁻¹ e 2 L.min⁻¹ e de agitação 150 rpm e 300 rpm.

Segundo SAKATO (1997), há vários tópicos que devem ser considerados ao analisar-se um aumento de escala, uma das etapas envolvidas diz respeito à quantidade de oxigênio requerida pelas células para que se consiga obter atividades metabólicas. DURAND (2003) relatou que a produção em larga escala é dificultada pelos problemas relacionados com a transferência de calor e de massa em biorreatores, uma vez que estes fenômenos são mais intensos em grandes biorreatores do que em escala de bancada.

Outra hipótese que deve ser levada em consideração é a perda de material (células e surfactina) durante o cultivo, devido à intensa formação de espuma. Apesar de haver um coletor de espuma com um volume de 2 L conectado ao gás efluente do fermentador, que devolve uma parte do líquido da cultura de volta para o biorreator, ao final da fermentação (72 horas), o coletor de espuma se encontra em parte preenchido pela espuma que transbordou e que não retornou ao biorreator. Outra parte da espuma que transborda é introduzida a um frasco com solução ácida, que contém as células e a surfactina; neste estudo, não foi analisado o precipitado que fica retido no frasco (Figura 27 e 28). BARROS *et al.* (2008b) estudaram a produção de surfactante a partir da coleta da espuma produzida durante a fermentação em reator por *Bacillus subtilis* LB5a utilizando manipueira como substrato, obtendo-se 2,4 g. L⁻¹ de surfactante na espuma coletada.

De acordo com vários autores (LEE e KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; CAMILIOS NETO, 2010; MITCHELL, 2006; MEIRA, 2006) a formação de espuma é um grande problema da produção de biossurfactantes, pois, junto com a espuma que sai do reator, há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, reduzindo a produtividade, ou até mesmo inviabilizando a fermentação.

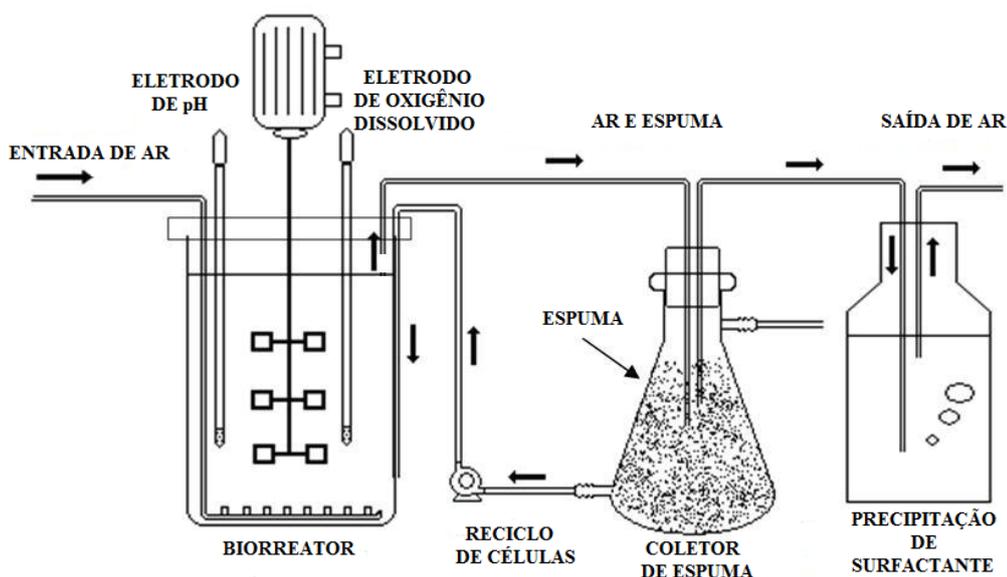


Figura 27. Fermentador de bancada utilizado para produção do biossurfactante de interesse. Fonte: GIRO *et al.*, 2009.



Figura 28 - Coletor de espuma com um volume de 2 L conectado ao gás efluente do fermentador. O reciclo celular foi designado para devolver uma parte do líquido da cultura de volta para o fermentador.

4.6 - Cinética da Produção de Surfactina, Crescimento Celular e Consumo do Substrato para os *Bacillus subtilis* LAMI005, LAMI009 e ATCC 6633 para os ensaios conduzidos em *Shaker*

4.6.1 - Determinação da fase exponencial de crescimento

A Figura 29 mostra os gráficos que representam a fase exponencial de crescimento celular para os microrganismos, *Bacillus subtilis* LAMI005, LAMI009 e ATCC 6633. A partir dos dados experimentais de crescimento celular, construíram-se as curvas de $\ln(x)$ em função do tempo (h) e, por regressão linear, determinou-se a fase de crescimento exponencial (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Ressalta-se que foram considerados no mínimo quatro pontos experimentais e consecutivos na fase exponencial. A tabela 14 mostra a taxa máxima de crescimento $\mu_{x\text{máx}}$ (h^{-1}), a duração das fases de adaptação e exponencial para os três microrganismos aqui estudados, utilizando a metodologia descrita por SCHMIDELL *et al.* (2001).

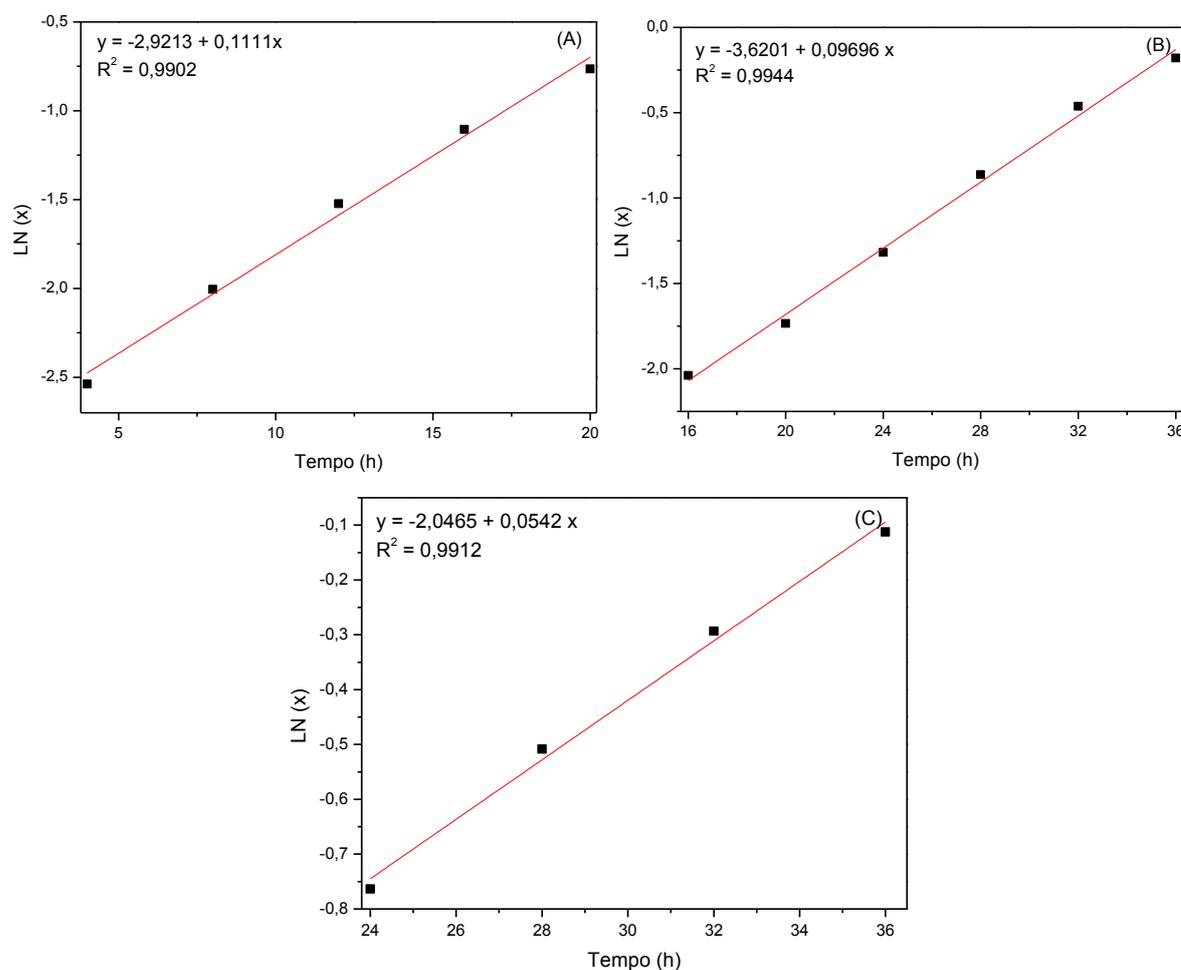


Figura 29 - Gráfico representativo para determinação da fase exponencial de crescimento dos ensaios fermentativos durante um período de 72 horas, utilizando *Bacillus subtilis* (A) LAMI005, (B) LAMI009 e (C) ATCC 6633 em meio mineral suplementado de glicerol, em *shaker* a 30°C, 180 rpm.

Podemos observar que a cepa LAMI005 apresenta menor fase de adaptação (4 h) quando comparada aos outras duas estudadas. A $\mu_{Xm\acute{a}x}$ foi semelhante para as cepas LAMI005 e LAMI009, e bastante superior do que a velocidade máxíma de crescimento do *B. subtilis* ATCC 6633. Observa-se também um maior rendimento de produto por grama de célula ($Y_{P/X}$) para *B. subtilis* LAMI005 com 0,48 g de surfactina/g de células enquanto que para os *B. subtilis* LAMI009 e *B. subtilis* ATCC 6633, o $Y_{P/X}$ foram respectivamente de 0,24 g de surfactina/g de células e 0,09 g de surfactina/g de células.

Tabela 14 - Informações sobre as fases de adaptação, fases exponencial, crescimento dos microrganismos avaliados para a produção de biossurfactante a partir de glicerol.

	<i>B. subtilis</i> LAMI005	<i>B. subtilis</i> LAMI009	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
Fase de adaptação (h)	4	16	24
Fase log (h)	4 - 20	16 - 36	24 - 36
$\mu_{X_{m\acute{a}x}}$ (h ⁻¹)	0,115 ± 0,04	0,128 ± 0,07	0,062 ± 0,01
$Y_{P/X}$ (g/g)	0,48	0,24	0,09
y (g/L.h)	0,0061	0,0048	0,0033

Como em qualquer outro processo fermentativo, o principal objetivo na produção de biossurfactantes é maximizar o rendimento e a produtividade, isto é, alcançar elevadas concentrações finais do produto a partir da conversão total do substrato no menor intervalo de tempo (LIN *et al.*, 1993). Foi observado que a fermentação utilizando a cepa microbiana de *B. subtilis* LAMI005 atingiu a maior produtividade ($y = 0,0061$ g/L.h), ao passo que a segunda maior produtividade foi obtida pela cepa de *B. subtilis* LAMI009 ($y = 0,0048$ g/L.h), enquanto que a cepa microbiana *B. subtilis* ATCC 6633 apresentou uma menor produtividade ($y = 0,0033$ g/L.h) que as cepas isoladas da estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal do Ceará (Tabela 14).

4.6.2 - Classificação do Processo Fermentativo

Calcularam-se as velocidades específicas de consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular (Figura 30).

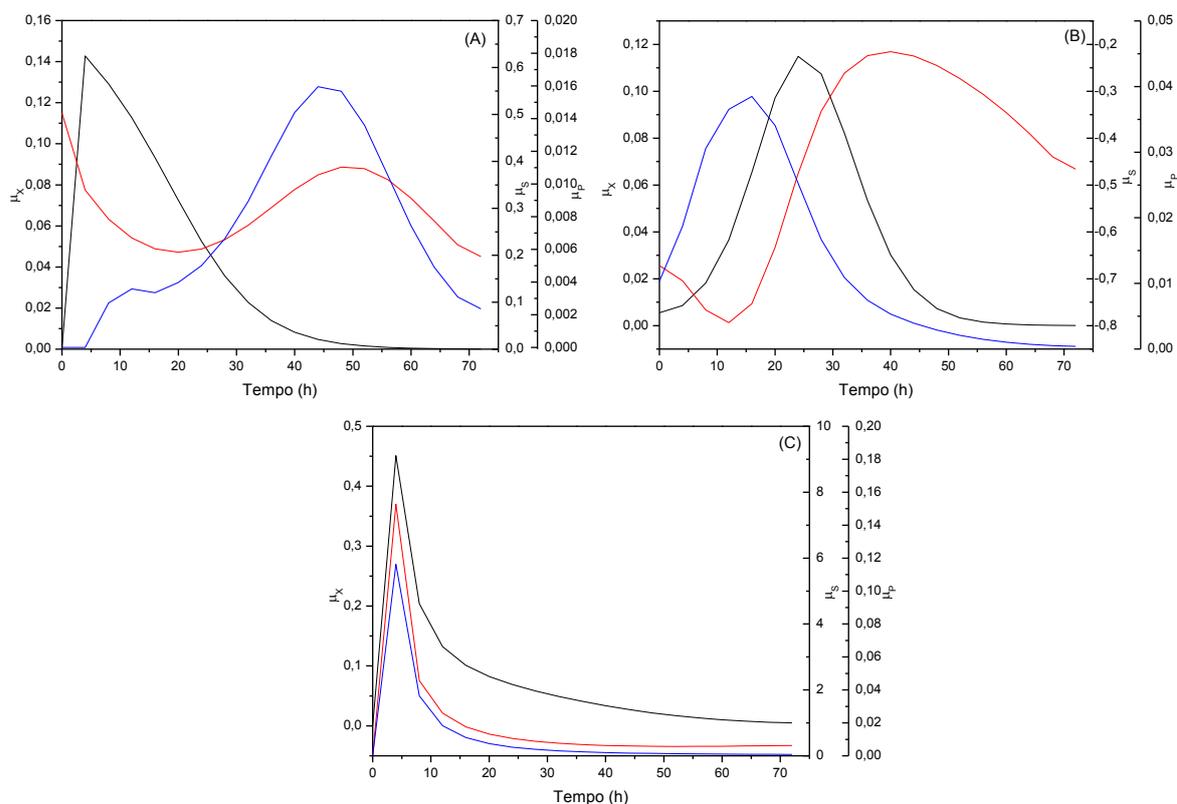


Figura 30 - Gráficos representativos das velocidades específicas dos ensaios fermentativos em *shaker* a 30°C, 180 rpm por 72 horas, utilizando os *Bacillus subtilis* (A) LAMI005, (B) LAMI009 e (C) ATCC 6633. (—) μ_x , (—) μ_s , (—) μ_p .

Pela comparação das velocidades específicas de formação do produto (μ_p), de crescimento do microorganismo (μ_x) e consumo de substrato (μ_s), para a fermentação conduzida pela cepa *B. subtilis* LAMI005 (Figura 30 A), podemos observar um aumento de μ_p com a diminuição de μ_x , este comportamento indica que o biossurfactante produzido se trata de um metabólito secundário (SCHMIDELL *et al.* (2001). Ao se observar, na Figura 15, a produção do biossurfactante, nota-se que a concentração de surfactina aumenta durante a fase estacionária de crescimento, confirmando a hipótese do metabólito secundário. A velocidade específica de consumo do substrato está relacionada à velocidade de formação de produto. Neste caso o microorganismo consumiu o substrato para preferencialmente produzir o produto de interesse e não para multiplicação celular. RAHMAN *et al.*, 2002 verificaram que inicialmente a produção de biossurfactante acompanhava a fase de crescimento microbiano. Porém, quando o crescimento microbiano cessou, entrando na fase estacionária, houve uma continuidade da síntese do biossurfactante caracterizando uma produção de biotensoativo

parcialmente associada ao crescimento microbiano. BENINCASA (2002) relata que após total consumo de nitrogênio do meio de cultivo, o microrganismo dirige seu metabolismo para a produção de biossurfactantes, que aumenta após a fase exponencial de crescimento.

A biossíntese do biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* LAMI009 foi maior na fase exponencial de crescimento celular, obtendo-se uma produção contínua entre 8 e 48 horas, quando foi observado uma pequena elevação da concentração de surfactina no ponto de 72 horas (Figura 15). Porém durante a fase exponencial do microrganismo observou-se crescente aumento do metabólito produzido. Então, fazendo-se uma comparação do crescimento celular e da produção do biossurfactante, concluiu-se que a produção do biossurfactante aconteceu, geralmente, de forma associada ao crescimento, se comportando como um metabólito primário. A Figura 30 B confirma este comportamento pois se observa uma diminuição de μ_s e μ_p quando μ_x diminui, ou seja, comportamento típico de formação de produto associado ao crescimento celular.

Com relação ao metabólito produzido pelo *B. subtilis* ATCC 6633, Figura 30 (C), respectivamente, as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) e produção de biossurfactante (μ_p) apresentaram perfis semelhantes. A velocidade de crescimento do microrganismo (μ_x) apresenta o andamento similar ao das outras duas curvas. Neste caso, a formação do produto está associada ao crescimento, trata-se de um metabólito primário associado ao crescimento (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

NEVES *et al.*, 2007, também classificaram como metabolismo primário a produção de biossurfactante, devido a ligação entre as curvas de taxa de crescimento específico (μ_x), taxa de consumo do substrato (μ_s) e taxa de formação de biossurfactante (μ_p), durante o cultivo do *B. atrophaeus* ATCC 9372 em 2,5 g. L⁻¹ de glicose e 10,0 g. L⁻¹ de caseína. DESAI & BANAT (1987) utilizaram *Bacillus* sp. IAF-343 para produção de biodispersan e consideraram a formação de produto como associada ao crescimento celular.

4.7 - Caracterização Química do Biossurfactante Produzido em Biorreator

4.7.1 - Espectrometria no Infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi gentilmente analisada pelo Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará – UFC. Pode ser usada para quantificação dos biossurfactantes, pois a maioria possui um radical carbonila, ligação éster ou ácido carboxílico, os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético (GARTSHORE e COOPER, 2000; LIMA, 2003). É usada também a espectrometria de ressonância magnética (RMN) para elucidação estrutural do biossurfactante (GARTSHORE e COOPER, 2000; FERNANDES, 2007; LIMA, 2003).

A espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta eficaz para a determinação de grupos funcionais e nos estudos de conformação e estrutura de compostos, permitindo também a obtenção do espectro vibracional completo da molécula. Esta técnica estuda a interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria, analisando a transição das vibrações normais moleculares (BRINGEL, 2007; FERNANDES, 2007).

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* (ARIMA *et al.*, 1968; KOWALL *et al.*, 1988) e sua estrutura geral, demonstrada na Figura 31, é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (LANG, 2002; KOWALL, *et al.*, 1998; KLUGE, *et al.*, 1988; BARROS, *et al.*, 2007). A estrutura esperada da molécula de surfactina segundo a literatura (NITSCHKE e PASTORE, 2002):

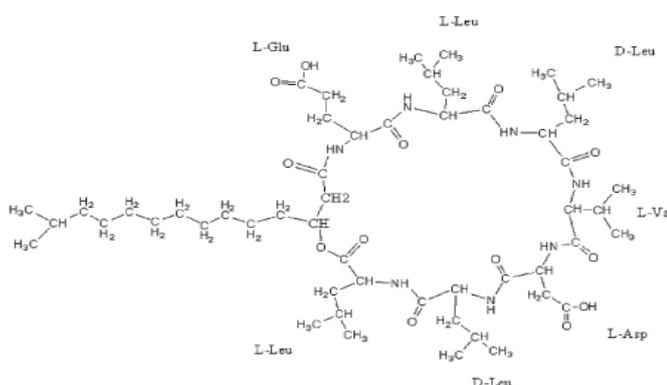


Figura 31 - Estrutura química da principal isoforma da surfactina (Nitschke e Pastore, 2002).

Na Figura 32 mostram os espectros FT-IR da surfactina comercial (padrão da Sigma) e da surfactina obtida da fermentação por *Bacillus subtilis* LAMI005 em biorreator.

Esta análise foi realizada apenas como uma ferramenta na identificação dos principais grupos constituintes da molécula de surfactina, comparando com os constituintes com os já citados na literatura.

As atribuições das bandas de absorção mais importantes estão sintetizadas a seguir e foram comparadas com os espectros obtidos por RUIZ, 2007; ARUTCHELVI *et al.*, 2009 e ROCHA, 2007. No espectro mostrado na Figura 32 podem ser vistas as bandas de absorção com máximos a 3307 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do O–H e N–H, observando-se bandas características de peptídeos. Outra banda intensa com máximo em 2958 cm^{-1} e 2927 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do C–H (CH_2) e (CH_3). Uma banda larga de média intensidade em 1726 cm^{-1} devido à absorção por grupos C=O de grupos –COOH refere-se à absorção de grupo carbonil de anel lactona. Em 1651 cm^{-1} verificou-se o estiramento da ligação C=O, referente à amida. As bandas 1044 cm^{-1} e $619,9\text{ cm}^{-1}$ apresentam a deformação das ligações C–H. A análise por FT-IR da surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio mineral suplementado com 2 % (v/v) de glicerol, mostrou a presença de anel lactona, bandas de amida, cadeia alifática e grupos –OH/ –NH. Estes resultados confirmam que a surfactina produzida é um lipopeptídeo cíclico.

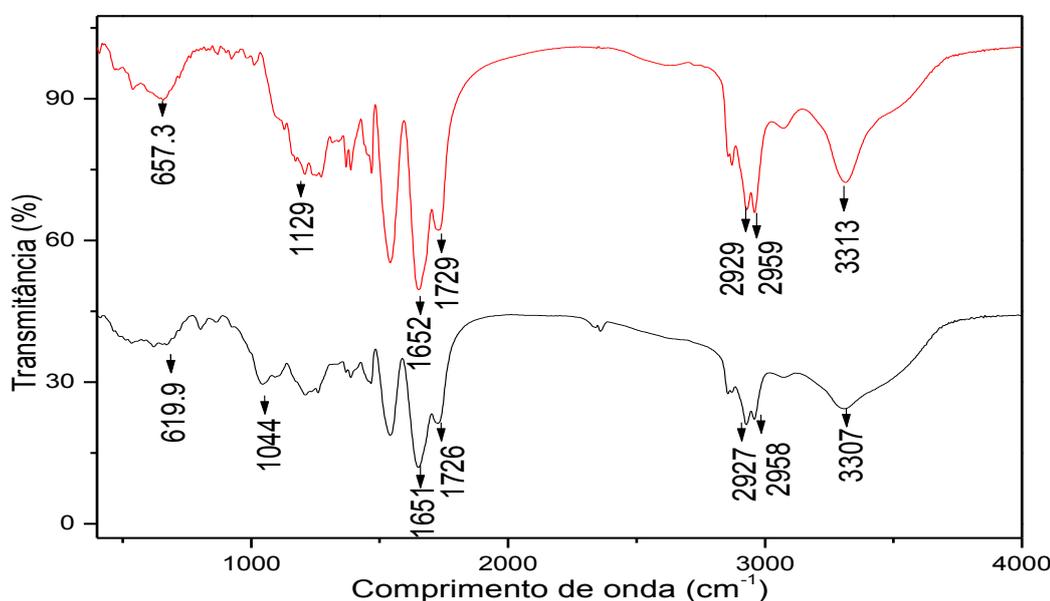


Figura 32 - Espectro na região do infravermelho da molécula de surfactina padrão da Sigma (---) e o da surfactina extraída (—), respectivamente.

4.8 – Comportamentos de Fases de Sistemas Emulsionados

Inicialmente, foi avaliado o poder da estabilidade emulsificante do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005, frente a diversas fontes hidrofóbicas (Tabela 15). Por meio da análise inicial do índice de emulsificação (E_{24}) descrito no tópico 3.3.5.3, foi possível observar resultados positivos para os óleos que apresentaram características de maior viscosidade, o biossurfactante foi bastante efetivo quanto a estabilidade da emulsão. Na realização dos diagramas de fases foram selecionados os óleos de motor, o NH 140 e o óleo de mamona, por terem apresentado uma emulsão mais estável. Nos outros casos, as emulsões não apresentaram uma boa estabilidade para a construção de um diagrama de fases.

Tabela 15. Avaliação da estabilidade emulsificante através da análise do ($IE_{24}\%$) do biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* LAMI005, frente a diversas fontes hidrofóbicas, para a construção do diagrama de fases.

Compostos Hidrofóbicos	Estabilidade Emulsificante
Óleo de Mamona	Sim
Óleo de Motor	Sim
Óleo de soja	Não
Gasolina	Não
Óleo diesel	Não
Naftênico Hidrogenado 20 (NH 20)	Não
Naftênico Hidrogenado 140 (NH 140)	Sim
N-hexadecano	Não
Querosene	Não

A emulsificação do óleo de motor pelo biossurfactante produzido apresentou uma emulsão uniforme, mais estável e extremamente viscosa, frente aos outros óleos analisados, e está ilustrada por uma fotografia na Figura 33. Como pode ser visto também através da ilustração da Figura 33, a amostra referência (óleo de motor de origem mineral e água pH 8,0), também formou uma emulsão, porém menos viscosa e menos estável, frente a emulsão formada pela surfactina, devido à presença de derivados de petróleo e alguns aditivos presentes na composição do óleo utilizado. Os sistemas de emulsões possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, sólidos finamente divididos que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre

as duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras estéricas e eletrostáticas (BERNHEIMER, 1970).

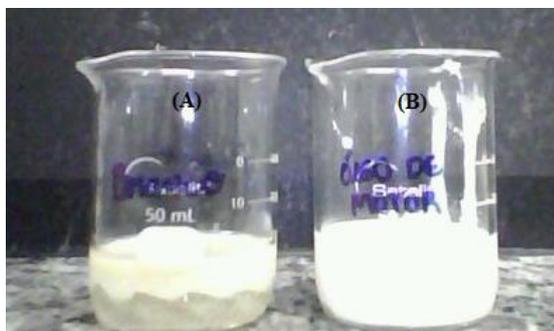


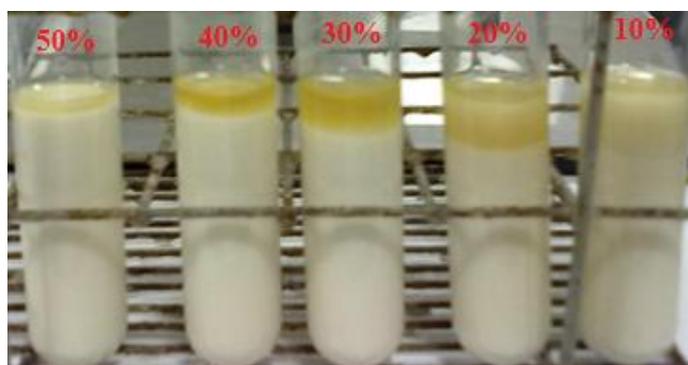
Figura 33 - Emulsificação do óleo de motor pelo biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio mineral suplementado com glicerol. (A) Branco (óleo de motor + água destilada pH 8,0) e (B) Emulsão (óleo de motor + solução de surfactina).

Os sistemas estudados foram constituídos de uma fase aquosa contendo misturas de composição de água pH 8,0 e surfactina e uma fase oleosa contendo óleo de motor, NH 140 e óleo de mamona.

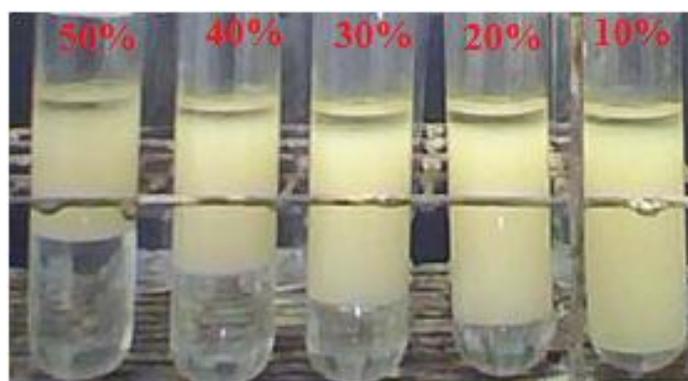
Em altas concentrações (acima de 30%) do surfactante, no diagrama com óleo de motor, observou-se uma fase aquosa em excesso, que se apresentou em forma de gotículas de água, devido a uma maior quantidade de água que as composições menores (10 e 20 %). Já para os diagramas com óleo de mamona e óleo NH 140, que apresentaram resultados similares, a fase aquosa em excesso partiu da condição inicial se apresentando mais expressiva que o diagrama com óleo de motor (Figura 34 e 35). Este fato também foi observado por UDDIN *et al.* (2001), quando estudou o diagrama de fases do sistema binário água-surfactante ($\text{Si}_{25}\text{C}_3\text{EO}_{15,8}$) obtendo excesso de água na condição inicial. Recentemente, tem havido poucos estudos sobre o efeito de fases oleosas no comportamento de fase de sistemas de surfactantes, principalmente relacionados com a surfactina.

A Figura 34 ilustra o resultado final da análise dos diagramas (surfactina - óleo de motor), (surfactina - óleo de mamona) e (surfactina - NH140). Observa-se, através desta figura, que o comportamento da fase aquosa no diagrama com óleo de mamona e o óleo NH 140 foi mais expressivo que no diagrama com óleo de motor, em que foi quase imperceptível o aparecimento da água, surgindo na forma de gotas. Com o aumento da temperatura observa-

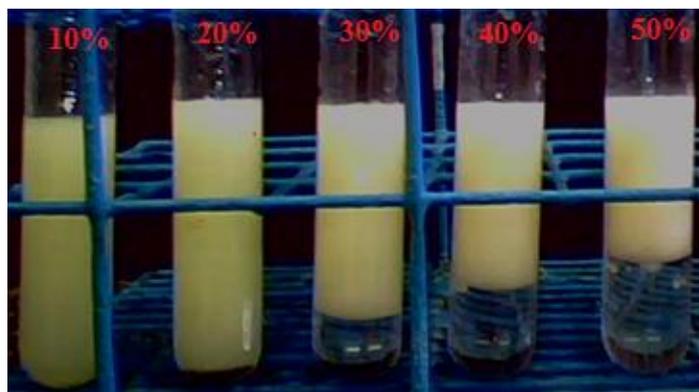
se que aumenta a quebra do complexo da emulsão formada por surfactina e óleo, surgindo uma fase oleosa, como pode ser visto pelos gráficos da Figura 34.



Óleo de Motor



Óleo de Mamona



Óleo NH 140

Figura 34 – Ilustração final da construção dos diagramas de fases (surfactina – óleo de motor), (surfactina – óleo de mamona) e (surfactina – óleo NH 140), respectivamente, com composições de 10 a 50 % de solução de surfactina após temperatura de 85 °C.

Os diagramas binários, que descrevem as composições dos sistemas estudados estão representados na Figura 35, que apresenta a variação das regiões de mudança de fases em função das composições analisadas de surfactina, observadas com o aumento da

temperatura. As áreas delimitadas pelas curvas denotam a região onde ocorre separação de fases.

No diagrama do sistema (surfactina - óleo de motor), foi observado que os valores mais baixos de concentração de surfactante (10, 20 e 30 %) atingiram a separação de fase mais rapidamente, em torno de 40 °C. Em valores de composição de 40 e 50 %, foram necessárias temperaturas mais elevadas para mudança de fase. Para os diagramas dos sistemas (surfactina - óleo de mamona) e (surfactina - óleo NH 140), obtiveram-se resultados similares no que diz respeito ao comportamento de transição de fases. A maiores concentrações de surfactina, a mudança de fase ocorreu em menores temperaturas para os sistemas (surfactina - óleo de mamona) e (surfactina - óleo NH 140). Porém, todas as composições analisadas de 10 a 50% de surfactina apresentaram mudança de fase em uma mesma faixa de temperatura, em torno de 70 a 80 °C. Devido aos degraus de temperatura serem de 5 em 5 °C, pode ter ocorrido a mudança de fase em temperatura intermediária, que não foi visto, portanto deve ser levada em consideração a sensibilidade limitada do método. Nestes sistemas foram necessárias temperaturas mais elevadas, em torno de 70 °C, para que fosse possível visualizar a separação da fase oleosa. Esse resultado é bastante positivo em relação à possibilidade de aplicações do biossurfactante analisado em diversos setores industriais. Com base nesses estudos da capacidade do biossurfactante em formar emulsões estáveis em variadas temperaturas, verificou-se que o produto de interesse pode ser aplicado nos setores de tratamento de resíduos e na biorremediação, visto através dos diagramas (surfactina - óleo de motor) e (surfactina - óleo NH 140) e em fluidos de corte, visto pelo diagrama (surfactina - óleo de mamona). Segundo ROCHA (2007), a capacidade dos biossurfactantes, em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, aumentam a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes, entretanto, os estudos ainda ocorrem a nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfactantes permanece ainda como um desafio. Com relação aos fluidos de corte, que são essenciais na produção de peças metálicas, está sendo utilizado o óleo de mamona como fluido de corte, que tem a vantagem de ser biodegradável, porém é necessário um tipo de tensoativo para fazer a ligação entre o óleo e a água, neste estudo o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* LAMI005 foi comprovado, pela construção dos diagramas de fases, que

pode ser utilizado na preparação de fluidos de corte, devido à formação de uma emulsão estável frente a elevadas temperaturas.

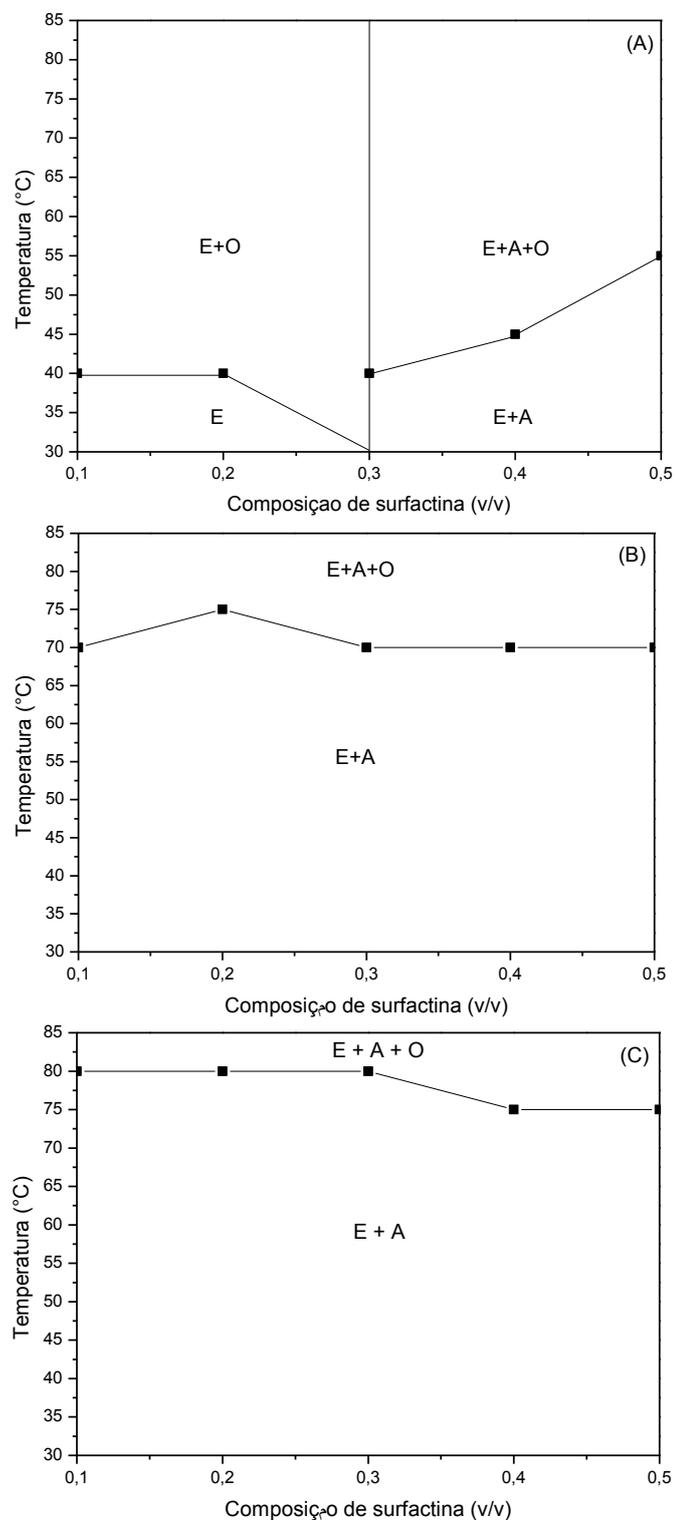


Figura 35 - Diagrama de fases para o sistema de solução de surfactina e fase oleosa em função da temperatura. (A) Óleo de motor; (B) óleo de mamona; (C) óleo NH 140. E - fase emulsionada; A - fase aquosa em excesso; O - fase óleo.

5 - CONCLUSÕES

O cultivo da cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 permitiu concluir que a glicerina residual do biodiesel usada neste trabalho se apresenta como uma fonte alternativa para a produção de surfactina, podendo ser utilizada como principal fonte de carbono e energia.

De acordo com os resultados obtidos da avaliação das sete cepas de *Bacillus sp.* isoladas da estação de tratamento da Universidade Federal do Ceará, apenas quatro reduziram a tensão superficial do meio livre de células, apresentadas como melhores potenciais produtoras de biossurfactantes após 48 h de cultivo em *shaker*, a saber: LAMI002, LAMI005, LAMI008 e LAMI009. Porém, das quatro cepas pré-selecionadas, apenas duas produziram um biossurfactante que conseguiu emulsionar as três fontes hidrofóbicas testadas (óleo de soja, querosene e n-hexadecano). Portanto, as cepas que obtiveram maior capacidade surfactante, avaliadas através dos dois métodos indiretos, foram *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009.

Em relação aos testes que foram conduzidos para avaliar a cinética do biossurfactante produzido pelas cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, selecionadas através do *screening*, a melhor produtora de surfactina foi a cepa de *Bacillus subtilis* LAMI005 que apresentou em 72 h de fermentação valor máximo de concentração do biossurfactante de 441,06 mg. L⁻¹, e também foi melhor do que a cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, obtido da Fundação André Tosello, que produziu uma concentração máxima de 158,14 mg.L⁻¹ em 72 h de fermentação.

A respeito dos experimentos realizados em biorreator de 4 L, observou-se uma produção significativa de biossurfactante, quando comparados aos valores reportados na literatura, chegando a 263,64 mg.L⁻¹, para o ensaio conduzido em meio sem extrato de levedura. Porém, a concentração de surfactina produzida em *shaker* foi superior. Uma das prováveis explicações é a concentração de oxigênio dissolvido no meio. Ressalta-se que, durante a fermentação em *shaker*, a taxa de transferência do oxigênio não pode ser determinada. Outra hipótese que deve ser levada em consideração é a perda de material (células e surfactina) durante o cultivo, devido à intensa formação de espuma.

Os espectros de FTIR indicaram a presença de grupamentos alifáticos, carbonilas, bandas de amida e grupos –OH/ –NH, característicos das moléculas de surfactina. Pode-se

concluir que o surfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* é um lipopeptídeo cíclico compatível com o espectro da surfactina disponível comercialmente.

Obtiveram-se resultados bastante positivos em relação à possibilidade de aplicações do biossurfactante analisado em diversos setores industriais, como biorremediação, tratamento de resíduos e em formulação de fluido de corte, através dos três diagramas de fases com os sistemas surfactina – óleo de motor, surfactina – óleo de mamona e surfactina – NH 140, para simular os comportamentos dinâmicos da produção de biossurfactantes.

6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Devido à diversidade de aplicações dos emulsificantes e da sua complexidade fica claro que os conceitos aqui apresentados neste trabalho serviram para novas perspectivas com relação à aplicação do biossurfactante e é apenas uma iniciação para trabalhos futuros que possam extrair novas aplicações para estes compostos;
- Planejar estudos para o aumento da produtividade do biossurfactante por fermentação em biorreator, otimizando a produção por *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado por glicerol, proveniente da transesterificação do biodiesel, como também estudar a influência da aeração e agitação na produção de biossurfactantes;
- Aprofundar os estudos de aplicações ambientais desses biossurfactantes relacionadas à área de biorremediação, como por exemplo, determinando-se o seu potencial em solos contaminados com petróleo;
- Estudar a estabilidade das emulsões e a atividade tensoativa do biossurfactante produzido, a diversas condições de processamento, em relação à variação do efeito da salinidade, da temperatura e do pH adicionados ao meio de cultura;
- Avaliar a toxicidade da surfactina produzida para possíveis aplicações em produtos alimentícios, que segundo a literatura (Barros *et al.*, 2007), a aplicação da surfactina em alimentos mostrou-se favorável a essa tendência, uma vez que evidências demonstraram possíveis atividades funcionais desse biossurfactante como agente preventivo a alguns tipos de doença. Estudos toxicológicos apontaram baixa toxicidade *in vivo*.
- Testar diferentes fontes de glicerol bruto.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMA, K.; KAKINIMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 31, p. 488-494, 1968.

ARUTCHELVI, J.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Production and Characterization of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* YB7. **Journal of Applied Sciences**, v. 9, p. 3151-3155, 2009.

AUFLEM, I. H. **Influence of asphaltene aggregation and pressure on crude oil emulsion stability**. Department of Chemical Engineering, Norwegian University of Science and Technology – Trondheim, 2002.

BARBOSA, M. M. C. e PAZ, M. C. F. Produção de Biossurfactantes por *Chromobacterium Violaceum* utilizando como Substrato óleo vegetal (Óleo de Pequi). **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa – PB, 2007.

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

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

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.º.2, p. 409-414, 2007.

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, ed. 28, 4, p. 979-985, 2008a.

BARROS, F. F. C; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v: 35, p. 1071–1078, 2008b.

BENICASA, M.; CONTIERO, J.; MARRESA, M. A; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBT growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.54, p. 283-288, 2002.

BEZERRA, M. S. **Levantamento e avaliação de critérios para ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rio Grande Norte, Natal/RN, Brasil, 2006.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, n. 152, p. 41-52, 1999.

BRINGEL, R. M. **Estudo Químico e reológico de ligantes asfálticos modificados por polímeros e aditivos**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 2007.

BRIEU, T. P. **Programa nacional de produção e uso de biodiesel: um balanço da primeira fase até 2008**. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em energia, Universidade de São Paulo, 2009.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N. DA; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Quimica. Nova**, v. XY, p 1-6, 2010.

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

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido**. Tese de doutorado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

CASAS J. A.; GRACIA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **J. Biosci Bioeng**, v. 88, p. 488-94, 1999.

CARRILO, P. G. Isolation and selection of biosurfactant-producing. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 12, p. 82-84, 1996.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CIRIGLIANO, M. C. e CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n° 4, p. 846-850, 1985.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES. **Revista de Ciência Exatas e Engenharias - Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.

COOPER, D. G.; MAEDONALD, 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.**, v. 42, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G. E GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl Environ Microbiol.**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G., PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental**, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CUBITTO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; SCHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SIÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, v. 15, p. 281, 2004.

CUNHA, R. E. P. **Modelagem matemática da separação gravitacional de emulsões de petróleo.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade Tiradentes – UNIT, Aracajú/ SE, 2007.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 25, p. 322-329, 1999.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**, (article in press), 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.113-125, 2003.

EVANS, F.D.; WENNERSTRÖM, H. The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet. **Wiley-VCH**, Nova Iorque, Ed. 2nd., p. 672, 1999.

FARIAS, K. V.; AMORIM, L. V.; FERREIRA, H. C.; PEREIRA, E. Estudo da reologia e espessura do reboco de fluidos de perfuração: influência de dispersantes e umectante aniônicos. **Cerâmica**, v. 52, p. 307-314, 2006.

FERNANDES, P. P. N. **Caracterização de Ligante Asfáltico Brasileiro e Avaliação da Presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)**. Dissertação de mestrado. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, 2007.

FERRAZ, C.; NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Produção de biossurfactantes por *Serratia marcescens*. Anais em CD-Row do **XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química**, Natal, 2002.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, vol. 31, nº. 8, p. 2091-2099, 2008.

FORMARIZ, T.P.; WANCZINSKI, B.J.; JÚNIOR-SILVA, A.A.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, Brasília, v.16, n.1, p.44-57, 2004.

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

GALLERT, J. WINTER. The potential of solid and liquid wastes as secondary resources for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 483-496, 2002.

GARTSHORE, J. Y. C. L. and COOPER, D. G. Quantitative analysis of biosurfactants using fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 169-172, 2000.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CATRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. BIODIESEL DE SOJA – Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, n.º. 5, p.1369-1373, 2007.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M. E 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.

GONÇALVES, V.L.C.; PINTO, B.P.; MUSGUEIRA, L.C.; SILVA, J.C.; MOTA, C.J.A. Biogasolina: Produção de éteres e ésteres da glicerina, Biodiesel, inclusão social, 2006.

GOSWAMI, P.; SINGH, H. D. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, p. 1-11, 1990.

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.

GUIMARÃES, M. J. O. C.; Garcia, M. E. F.; Rodrigues, K. K.; Holanda, D. C. B. Efeito da adição de um surfactante reativo nas propriedades de nanolátices acrílicos. **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006.

HEYD, M.; FRANZREB, M.; HAUSMANN, R.; SYLDATK, C; BERESMEIER, S. Integral Continuous Microbial Rhamnolipid Production. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 74 –97, 2007.

KARINEN, R.S.; KRAUSE, A.O.I. New biocomponents from glycerol. **Applied Catalysis A: General**, v. 306, p. 128-133, 2006.

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. **Biotechnol Appl Biochem.**, v. 31, p. 249–253, 2000.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactant, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS Lett.**, v. 231, p. 107-110, 1988.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Appl. Chem.**, v.64 (11), p. 1731-1737, 1992.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P. AND ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 204, p. 1-8, 1998.

LANG, S; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 21, p. 45, 1987.

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

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LEE, B.S.; KIM, E.K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639-647, 2004.

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

LIMA, C. J. B.; SÉRVULO, E. F. C. e CARDOSO, V. L. Potencialidade de culturas de *pseudomonas aeruginosa* para a produção de biosurfactante. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 73 - 79, 2007.

LIMA LOBATO, A. K. C.; MACEDO, G. R.; MAGALHÃES, M. M. A.; BEZERRA, M. S.; ALMEIDA, A. F; COSTA, A. S. S. Estudo cinético da produção de biosurfactante. **Anais em CD-Row do XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química**, Natal, 2002.

LIMA, T. M. S. **Produção de biosurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa**. Tese de Magister Scientiae. Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa/MG, 2003.

LIN, S. C.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* IF-2. **Biotechnology Program**, v 9, p.138-145, 1993.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity. **Adv. Appl. Microbiol**, v. 52, p. 101-121, 2003.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactants production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45° C. **Journal of surfactants and detergents**, v. 5, n. 1, p. 11-17, 2002.

MEDEIROS, S. M. **Estudo da auto-associação de bipolímeros com surfactantes**. Dissertação de Mestrado, Florianópolis, p. 5, 2009.

MEIRA, J. A. **Produção de biosurfactante por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 2007.

MENDES, J. S.; SILVA, J. S.; FERREIRA JR, A. O. C.; PINHEIRO, R. S.; FERREIRA, A. L. O.; GIOVANILTON, F. S. Produção de etanol por *E. coli* utilizando glicerol como substarto. **Congresso Rio Oil & Gas**, Rio de Janeiro, 2010.

MERCIER, P.; YERUSHALMI, L.; ROULEU, D.; DOCHAIN, D. kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. **J. Chem, Technol.Biotechnol.**, v. 55, p. 111-121,1992.

MESSIAS, S. B. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. Tese de Doutorado, São José do Rio Preto, p. 19 – 23, 2008.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, Nadia; BEROVIC, Marin. Solid- State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation. **Heidelberg: Springer**, 1. ed, v. 1, p. 450, 2006.

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

MOTA, C. J. A.; PERES, S.; RAMOS, L. P. **Relatório de Co-produtos do Biodiesel apresentado no Seminário de Co-produtos do Processo de Produção do Biodiesel**, 30-31 Maio, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. **Environmental Progress**, n. 18, p. 31-35, 1999.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. n. 60, p. 371-380, 2001.

MULLIGAN, C. N. Environment applications for biosurfactants. **Environmetal pollution**, v. 133, p.183-198, 2005.

NEU, T. R. e PORALLA, K. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.32, p. 521-525, 1990.

NEVES, L. C. M.; OLIVEIRA, K. S.; KOBAYASHI, M. J.; PENNA, T. C. V.; CONVERTI, A. Biosurfactant Production by Cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in Semidefined Glucose/Casein-Based Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 136–140, 2007.

NIEVES, J. Effect of demulsifiers on the separation of water-in-oil emulsions. Tese de doutorado. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Swiss, 1987.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. V. G.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactants production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

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

OLIVEIRA, D. W. F. **Produção de Biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Eng. Química, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2010.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação Cinética da Produção de Biossurfactantes Bacterianos. **Química Nova**, v. 32, nº 8, p. 2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da Produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, p. 9, 2006.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bactéria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 50, p. 71-77, 2006.

PORTER, M. R. Handbook of surfactants. New York: **Chapman & Hall**, 2ª edição, 1994.

RAHMAN, K. S. M.; RHAMAN, T. J.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using lowcost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p.1277-1281, 2002.

RAMNANI, P.; KUMAR, S. S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RGI: bioformulation as detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3352- 3359, 2005.

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.

RIVALDI, J.D ; SARROUH, B. F. ; FIORILO, R ; SILVA, S. S. . Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2008.

ROCHA, M. V. R., OLIVEIRA, A. H. S., SOUZA, M. C. M., GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

ROCHA, M. V. R. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2007.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative médium for biosurfactant production by probiotic bactéria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006.

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

ROSENBERG, E; RON, E. Z. High and low molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios a base de melão e manipueira**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

RUIZ, J. I. R. **Efeito da temperatura, concentração, polaridade do meio e de surfactante sobre a reologia e morfologia de emulsões com petróleo oriundo de campos maduros**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal da Bahia, 2007.

RUFINO, R. D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica***. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/Pernambuco, Brasil, 2006.

SAKATO, N. Fermentation and biochemical engineering hand book- principles, process design, and equipament. Segunda edição. **Noyes publication**, USA, cap. 1, p. 2, 1997.

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

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS A. S.; PEREIRA JR. N. e FREIRE, D. M. G. Production of Biosurfactants from

Pseudomonas aeruginosa PA1 Isolated in Oil Environments. **Braz. J. Chem.Eng.**, v. 19 (2), p. 159–166, 2002.

SANTOS, C. F. C. **Seleção de linhagem de levedura produtora de biosurfactante e estudo fermentativo para sua produção.** Dissertação Mestrado, Universidade de Campinas, 1997.

SANTOS, E. C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 43, 2004.

SANTOS, L. V. **Emulsificantes – modo de ação e utilização nos alimentos.** Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, 2008.

SAR, N. e ROSENBERG, E. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. **Current Microbiology**, v. 9, p. 309-314, 1983.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtaneid from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electron. J. Biotechnol.** v. 9, p. 400, 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociencia Industrial.** São Paulo: E. Blücher, v. 2, 2001.

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

SOUSA, J. R. **Produção de biosurfactantes a partir da glicerina obtida da produção de biodiesel.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Eng. Química, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2008.

SOUZA SOBRINHO, H. B. DE. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biosurfactante por *Candida sphaerica*.** Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, 2007.

SOUZA, F. A. S. D. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar.** Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.

STAMPFLI, L; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v. 52, p. 353-360, 1995.

STACHELHAUS, T; MOOTZ, H. D.; MARAHIEL, M. A. Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell. **Washington: ASN.**, 2002.

SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 263-269, 1998.

UDDIN, H. M. D; RODRÍGUEZ, C.; WATANABE; KENICHI; LOPEZ-QUINTELA, A.; KATO, T.; FURUKAWA, H.; HARASHIMA, A.; KUNIEDA, H. Phase Behavior and Formation of Reverse Cubic Phase Based Emulsion in Water/Poly(oxyethylene) Poly(dimethylsiloxane) Surfactants/Silicone Oil Systems. **American Chemical Society, Langmuir**, v.17, p. 5169-5175, 2001.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1329-1334, 2005.

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

WANG, D.; XU, Y.; HU, J.; ZHAO, G. Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing.**, v. 110 (4), p. 340–346, 2004.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, p. 724-728, 1998.

WEI, Y. H.; WANG, L.; CHANG, J. S.; KUNG, S. S. Identification of Incuced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Universidade de Yuan Ze**, 2003.

WEI, Y.; LAI, C.; CHANG, J. Using taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 40-45, 2007.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A., WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. physiological aspects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p.604–620, 2006.

ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. CRC Critical Reviews in Biotechnology, **Boca Raton**, v. 1, n. 2, p. 87 107, 1984.

ANEXO A

Curva Padrão para Concentração de Biomassa dos Microrganismos *Bacillus subtilis* LAMI005, LAMI009 e ATCC 6633 cultivados em meio mineral suplementado com glicerol.

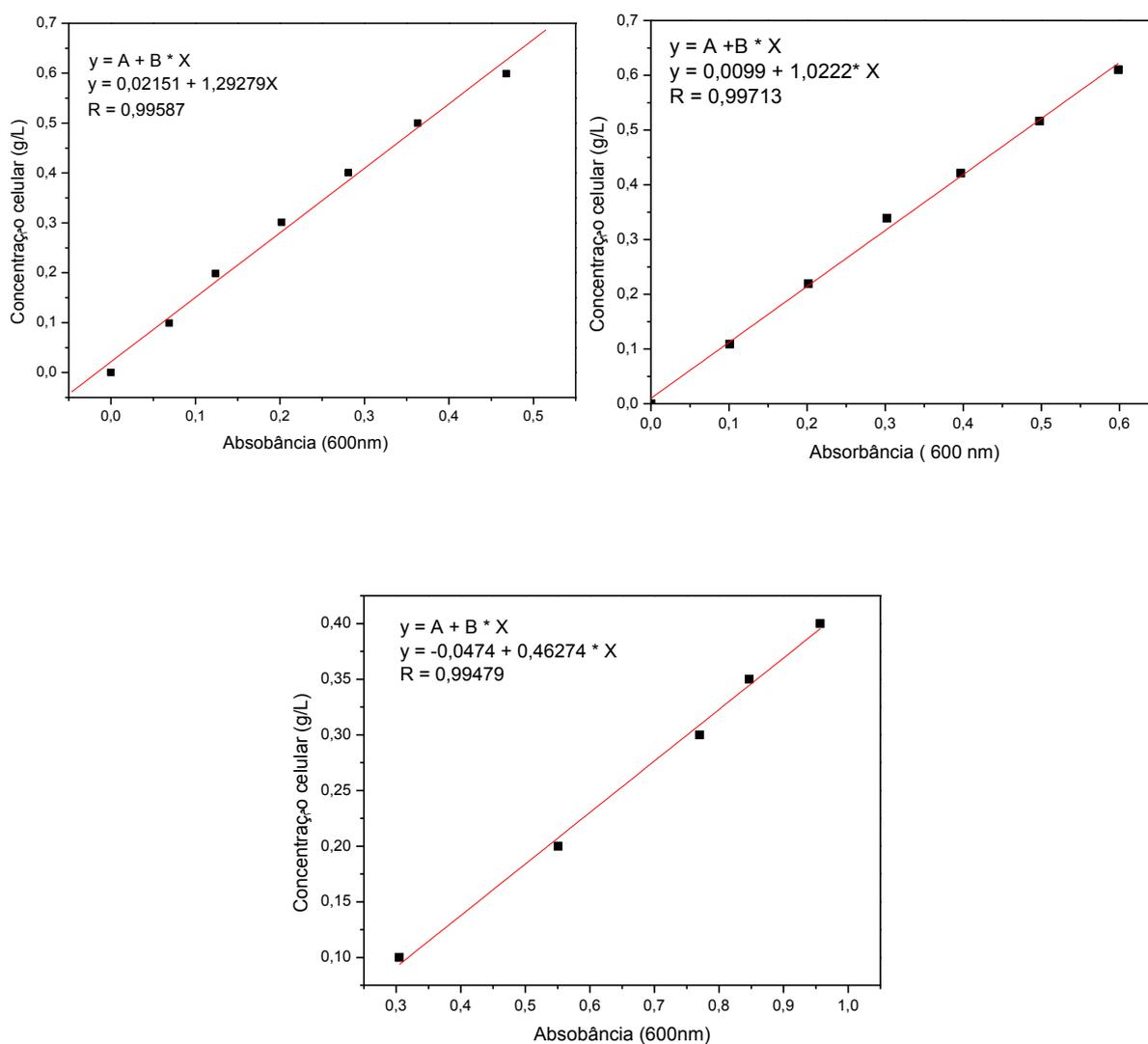


Figura 1A – Curva padrão para identificação da concentração de biomassa dos microrganismos *Bacillus subtilis* LAMI005, LAMI009 e ATCC 6633, respectivamente.

ANEXO B

Curva Padrão para Identificação das Concentrações de Surfactina Produzida por *Bacillus subtilis* Cultivado em Meio mineral suplementado de Glicerol.

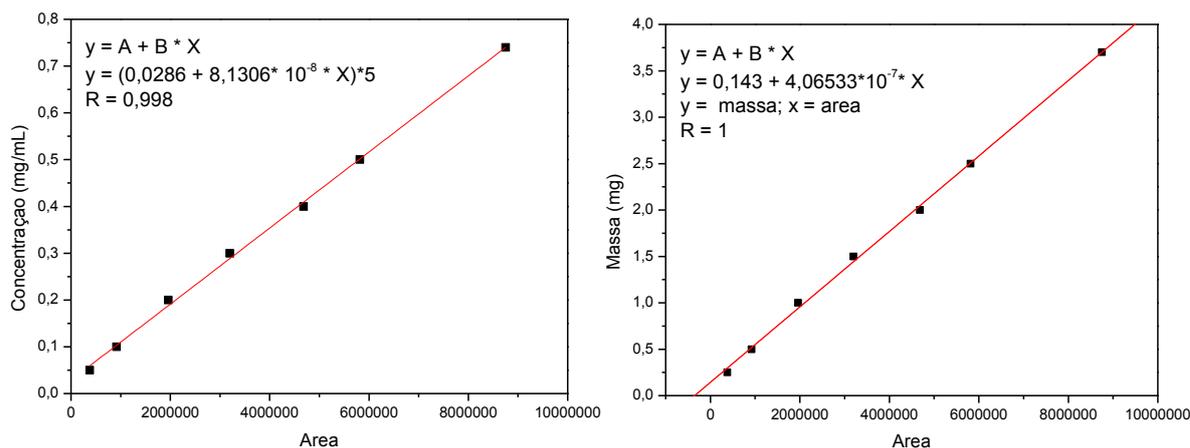


Figura 1B – Curva padrão para identificação da massa obtida e da concentração de surfactina, para a surfactina ressuspendida em água pH 8,0, para os ensaios fermentativos conduzidos em mesa agitadora para os *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 em meio mineral suplementado com glicerol.

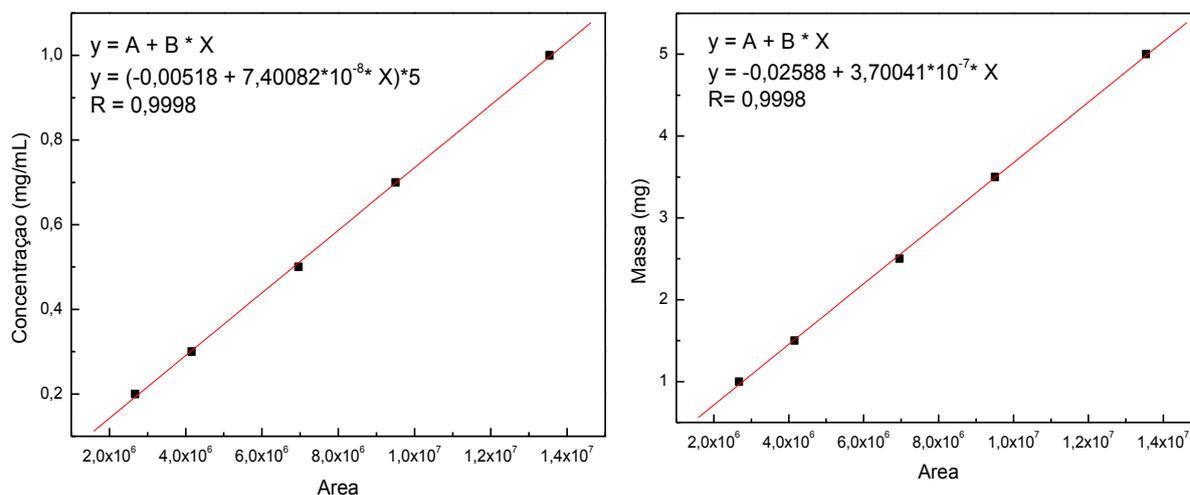


Figura 2B – Curva padrão para identificação da massa obtida e da concentração de surfactina, para a surfactina ressuspendida em metanol, para os ensaios fermentativos conduzidos em biorreator para os *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado com glicerol.

ANEXO C

Curva Padrão para Detecção da Concentração do Substrato.

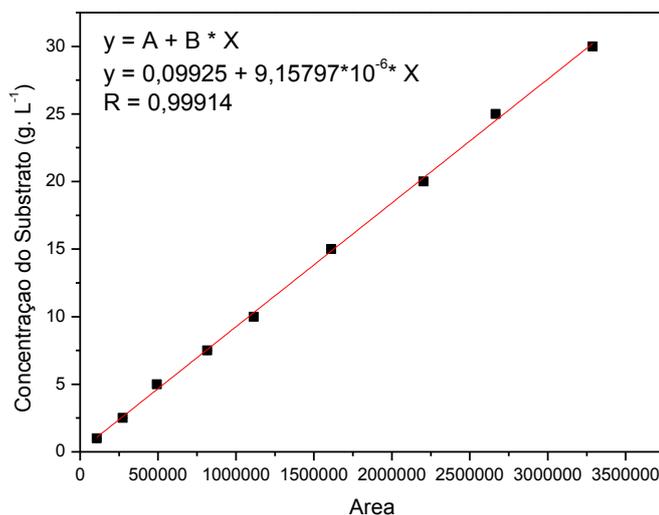


Figura 1C – Curva padrão para identificação da concentração do substrato analisado em HPLC dos ensaios fermentativos conduzidos em mesa agitadora utilizando *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado com glicerol.

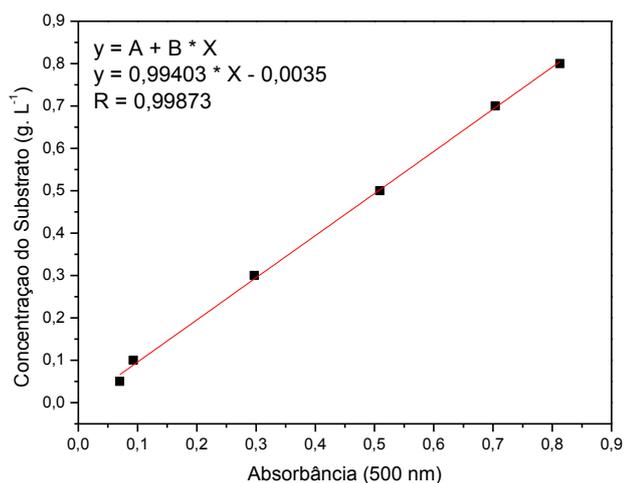


Figura 2C – Curva padrão para identificação da concentração do substrato analisado pelo Kit enzimático dos ensaios fermentativos conduzidos em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado com glicerol.

ANEXO D

Curva Padrão para Detecção da Concentração de Ferro.

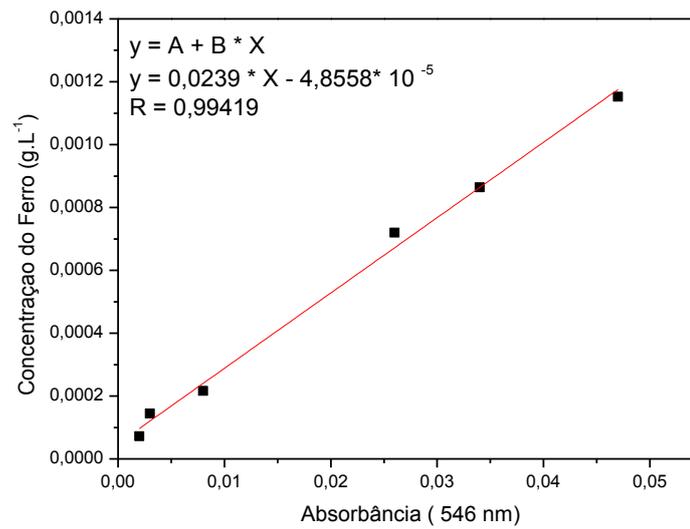


Figura 1D – Curva padrão para identificação da concentração de ferro analisado pelo Kit enzimático dos ensaios fermentativos conduzidos em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado com glicerol.