

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANDRESSA LAÍS MARIA DE MELO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
BIOSURFACTANTE EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

JOÃO PESSOA-PB

2019

ANDRESSA LAÍS MARIA DE MELO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
BIOSURFACTANTE EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

**JOÃO PESSOA-PB
2019**

ANDRESSA LAÍS MARIA DE MELO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE EM
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

JOÃO PESSOA-PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528b Melo, Andressa Laís Maria de.

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
BIOSSURFACTANTE EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS / Andressa
Laís Maria de Melo. - João Pessoa, 2019.

84 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.

Coorientação: Andrea Lopes Oliveira Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/PPGEQ/CT.

1. tensão superficial. 2. resíduos agroindustriais. 3.
emulsificação. 4. melaço. I. Santos, Sharline
Florentino de Melo. II. Ferreira, Andrea Lopes
Oliveira. III. Título.

UFPB/BC

ANDRESSA LAÍS MARIA DE MELO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIODISSURFACTANTE EM
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 27 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

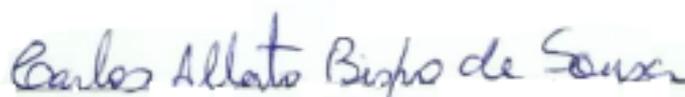


Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – PPGEQ/CT/UFPB
(ORIENTADORA)

Profa. Dra. Andrea Lopes Oliveira Ferreira – PPGEQ/CT/UFPB
(CO-ORIENTADORA)



Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida – CBIOTEC/UFPB
(EXAMINADOR EXTERNO)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa- CT/UFPB
(EXAMINADOR EXTERNO)

AGRADECIMENTOS

Às professoras Sharline Florentino de Melo Santos e Andrea Lopes de Oliveira Ferreira pela orientação, dedicação, paciência, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Alany meu agradecimento especial pela convivência, amizade e ajuda com os experimentos no início dessa pesquisa.

Aos amigos da minha turma do mestrado, Jéssica, Karina, José Eduardo, Bárbara, Gracimário, Jader e especialmente à Roxana pela amizade durante esses anos.

Aos amigos do laboratório: Bruna, Lorena, Josevan e Leanderson pelo companheirismo, amizade e troca de conhecimentos.

Aos técnicos do laboratório de bioengenharia, Débora e Ary, por toda colaboração, paciência e amizade.

À técnica do laboratório de petróleo Tarsila por toda a ajuda com a utilização do tensiômetro.

Aos professores do PPGEQ, em especial ao professor Nagel Alves por tudo que me ensinou durante esses anos e por todas as dúvidas sanadas.

À professora Fabiola Dias da Silva Curbelo, coordenadora do laboratório de petróleo da UFPB, por todos os conhecimentos passados e por possibilitar a utilização do tensiômetro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas de origem biológica que possuem capacidade emulsificante e de reduzir tensões superficiais e interfaciais, podendo ser obtidos por leveduras, fungos e bactérias. Eles apresentam vantagens quando comparados aos surfactantes de origem química, como tolerância à alta temperatura, pH e salinidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. O emprego de substratos alternativos como resíduos agroindustriais para sua produção é opção para reduzir os custos e o impacto ambiental da má disposição destes resíduos no ambiente. O trabalho teve como objetivo selecionar bactérias produtoras de biossurfactantes, avaliar a produção a partir de diferentes substratos e verificar a estabilidade do biossurfactante produzido, bem como sua aplicação na remoção de óleo adsorvido em solos. Foram testadas 20 bactérias, sendo 8 isoladas do solo e 12 isoladas da torta de filtro de uma agroindústria sucroalcooleira. Após a seleção da bactéria, foi realizada a avaliação das fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biossurfactantes. Assim, cinco substratos foram usados: melaço de cana, vinhaça, manipueira, polpa de coco, adicionados de óleo de soja como indutor, e quatro fontes de nitrogênio: ureia, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de amônio. Para avaliar a influência da concentração da fonte de nitrogênio, razão de aeração e do indutor na concentração de células, redução de tensão superficial e no índice de emulsificação em óleo de soja e em querosene foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central. Foram realizados testes de estabilidade com o caldo bruto livre de células em relação à temperatura (100°C e 120°C), salinidade (0-14% m/v) e pH (3-10). O biossurfactante obtido foi aplicado em testes de remoção de óleo de motor usado adsorvido em areia da praia. Os melhores resultados foram obtidos com a linhagem JS20, apresentando tensão superficial final em meio composto de glicose suplementado com óleo de soja residual de 40,56 mN/m e índice de emulsificação em óleo de motor de 96,10%; em meio com melaço e óleo de soja residual o valor foi de 49,57 mN/m. Para as fontes de carbono e nitrogênio foram considerados os melhores resultados obtidos para o crescimento celular e índice de emulsificação. Os meios formulados com melaço suplementado com óleo de soja residual e polpa de coco como indutor e utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio foram os que apresentaram os maiores índices de emulsificação ($IE_{\text{óleo de motor}} = 100\%$; $IE_{\text{óleo de soja}} = 51,94\%$ e $IE_{\text{querosene}} = 42,31\%$) e de crescimento celular. Os resultados obtidos no planejamento experimental mostraram que a melhor condição para a produção de biossurfactantes foi em meio com melaço (10 g/L de AR) suplementado com polpa de coco (20g/L), 1 g/L de sulfato de amônio e 0,67 de razão de aeração, apresentando capacidade de emulsificação de 100% em óleo de motor e 50% em querosene. O caldo bruto livre de células foi estável em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade. Em testes de remoção de óleo adsorvido em areia foi obtido um percentual de remoção de 78,71%.

Palavras-chave: tensão superficial, resíduos agroindustriais, emulsificação, melaço

ABSTRACT

Biosurfactants are metabolic products of yeasts, fungi and bacteria that have high emulsifying capacity and the ability to reduce the surface and interfacial tensions. They have several advantages when compared to chemical surfactants, such as their stability to high temperature, pH and salinity, as well as biodegradability and low toxicity. The use of alternative carbon sources such as agroindustrial wastes for their production is an option to reduce the high costs attached and the environmental impact of the poor disposal of these wastes in the environment. The aim of this work was to select biosurfactant-producing bacteria, to evaluate the production from different substrates as well as to verify the stability of the produced biosurfactant and its application for oil removal from contaminated soil. Twenty bacteria isolated from a sugar-alcohol agroindustry were tested, eight of which were isolated from the soil and twelve isolated from the agroindustrial residue called filter cake. After the selection of the bacteria, the carbon and nitrogen sources were evaluated for the production of biosurfactants. Thus, five substrates were used: cane molasses, vinasse, cassava wastewater, coconut pulp and soybean oil as inductor, and four nitrogen sources: urea, yeast extract, sodium nitrate and ammonium sulfate. A 2³ factorial experimental design with three replications at central point was carried out in order to evaluate the influence of nitrogen source concentration, aeration and inductor ratio on cell concentration, reduction of surface tension and emulsification index in soybean oil and kerosene. The stability of the cell free broth was tested in terms of temperature (100°C e 120°C), salinity (0-14% m/v) and pH (2-8). The obtained biosurfactant was applied in tests of motor oil removal from contaminated sand. The best results were obtained with the bacteria JS20, isolated from soil. The final surface tension in a medium composed of glucose supplemented with residual soybean oil was 40.56 mN/m and emulsion index of 96.10 in motor oil; in a medium composed of molasses and residual soybean oil, the surface tension was 49.57 mN/m. For carbon and nitrogen sources, the best results were those obtained from cell growth and emulsion index. The medium formulated with molasses as carbon source supplemented with residual soybean oil or coconut pulp as inductor and using ammonium sulfate as nitrogen source were the ones that showed the best emulsification index (IE motor oil = 100%; IE soybean oil = 51%; IE_{kerosene}=42.31%). The results obtained in the experimental design showed that the best condition for the production of biosurfactants was in medium composed of molasses (10 g/L of reducing sugars) supplemented with coconut pulp (20 g/L), 1 g/L of ammonium sulfate and 0.67 of aeration ratio. In this condition, it was obtained 100% of emulsion index in motor oil and 50% in kerosene. The cell free crude broth was stable over a wide range of pH, temperature and salinity. In oil removal from contaminated sand tests, it was possible to achieve a percentage removal of 78.71%.

Key word: surface tension, agroindustrial wastes, emulsification, cane molasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de surfactante	15
Figura 2 - Forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido.....	16
Figura 3 - Solubilidade, tensão superficial e tensão interfacial em função da concentração de surfactante.....	16
Figura 4 - Metodologia do procedimento experimental.....	28
Figura 5 - Polpa de coco (A) após o primeiro processamento; (B) após o processamento com água em uma proporção de 1:1; (C) depois de filtrada	29
Figura 6 - Esquema ilustrativo do processo de propagação do inóculo.....	31
Figura 7 - Composição dos meios formulados para avaliação das fontes de carbono.....	36
Figura 8 - Areia antes da adsorção (A) e depois da adsorvida com óleo de motor usado por 5 dias (B)	38
Figura 9 - Bactéria isolada do solo, JS20.....	43
Figura 10 -Perfil cinético de crescimento em diferentes fontes de carbono	45
Figura 11 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato da bactéria JS20 nos meios de glicose com óleo de soja residual (1) e glicose com polpa de coco (2)	46
Figura 12 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato a partir da bactéria JS20 nos meios de melação com óleo de soja residual (3), melação com polpa de coco (4) e melação com vinhaça e óleo de soja residual (5)	46
Figura 13 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato a partir da bactéria JS20 no meio com polpa de coco (6)	47
Figura 14 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato a partir da bactéria JS20 no meio com manipueira e óleo de soja residual (7)	48
Figura 15 - Índice de emulsificação das fontes de carbono em 96h de cultivo.....	50
Figura 16 - Crescimento celular em diferentes fontes de nitrogênio	52
Figura 17- Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando uréia (1 g/L) como fonte de nitrogênio	53
Figura 18 - Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando extrato de levedura (1 g/L) como fonte de nitrogênio.....	53
Figura 19 - Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando nitrato de sódio (1 g/L) como fonte de nitrogênio	54
Figura 20 - Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando sulfato de amônio (1 g/L) como fonte de nitrogênio.....	54
Figura 21 - Índice de emulsificação do caldo fermentado livre de células utilizando diferentes fontes de nitrogênio às 96h cultivo.....	56
Figura 22 - Diagrama de Pareto para a variável concentração de células.....	58
Figura 23 - Superfície de resposta da variável biomassa	59

Figura 24 - Diagrama de Pareto da variável índice de emulsificação em óleo de soja.....	60
Figura 25 - Superfície de resposta da variável índice de emulsificação em óleo de soja	62
Figura 26 - Diagrama de Pareto da variável índice de emulsificação em querosene	63
Figura 27 - Superfície de resposta da variável índice de emulsificação em querosene	65
Figura 28 - Diagrama de Pareto para a redução da tensão superficial.....	66
Figura 29 - Percentual de remoção de óleo adsorvido em areia.....	67
Figura 30 - Aspecto da areia adsorvida (A) antes do processo de remoção; (B) após remoção utilizando água destilada; (C) biossurfactante bruto com coco como indutor e com a presença de células; (D) biossurfactante bruto com coco como indutor e sem a presença de células; (E) Tween 80.....	68
Figura 31 - Curva de crescimento celular e concentração de ART na melhor condição	69
Figura 32 - Índice de emulsificação em óleo de motor e querosene ao longo de 72h de cultivo obtidos no estudo da melhor condição	70
Figura 33 - Concentração micelar crítica para o caldo fermentado livre de células obtido na melhor condição.....	71
Figura 34 - Efeito da salinidade na estabilidade do biossurfactante em relação à tensão superficial	73
Figura 35 - Efeito da salinidade na estabilidade do biossurfactante em relação ao índice de emulsificação	73
Figura 36 - Efeito do pH sobre a estabilidade do biossurfactante	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potenciais funções e campos de aplicação dos biossurfactantes.....	20
Tabela 2 - Principais classes de biossurfactantes e os microrganismos envolvidos.....	23
Tabela 3 - Composição do meio	35
Tabela 4 - Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental	37
Tabela 5 - Características físico-químicas dos substratos utilizados	40
Tabela 6 - Índice de emulsificação, tensão superficial final e percentual de redução da tensão superficial das bactérias isoladas do solo e da torta de filtro utilizando como substrato glicose (10 g/L) suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual.....	41
Tabela 7 - Índice de emulsificação em óleo de soja, Tensão superficial e percentual de redução da tensão superficial das bactérias JTF7, JTF14, JS18, JS19 e JS20 em 96h de cultivo, utilizando melaço como substrato em meio com e sem adição de sais.....	42
Tabela 8 - Composição dos meios de cultivo utilizados para a avaliação das fontes de carbono.....	44
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos das fontes de carbono	49
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos dos cultivos utilizando diferentes fontes de nitrogênio	55
Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.....	57
Tabela 12 - Coeficientes de regressão para biomassa.....	58
Tabela 13 - Análise de variância para a biomassa	59
Tabela 14 - Coeficientes de regressão para o índice de emulsificação em óleo de soja	61
Tabela 15 - Análise de variância para o índice de emulsificação em óleo de soja.....	62
Tabela 16 - Coeficientes de regressão para o índice de emulsificação em querosene.....	64
Tabela 17 - Análise de variância para o índice de emulsificação em querosene.....	64
Tabela 18 - Coeficientes de regressão para a redução da tensão superficial.....	65
Tabela 19 - Tensão superficial média e desvio dos caldos brutos obtidos nas melhores condições	67
Tabela 20 - Efeito da temperatura na estabilidade do biossurfactante.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 SURFACTANTES.....	15
2.2 BIOSSURFACTANTES.....	17
2.2.1 Aplicações	18
2.2.2 Microrganismos produtores	19
2.2.3 Classificação	21
2.3 UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS.....	23
2.3.1 Óleo de soja residual	24
2.3.2 Melaço de cana	25
2.3.3 Vinhaça	26
2.3.4 Manipueira	26
2.3.5 Polpa de Coco	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 RESÍDUOS UTILIZADOS.....	29
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS.....	29
3.2.1 pH	30
3.2.2 ° Brix	30
3.2.3 Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais	30
3.2.4 Lipídios	30
3.3 MICRORGANISMOS.....	30
3.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	31
3.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	31
3.6 ANÁLISES.....	32
3.6.1 Determinação do Crescimento Celular	32
3.6.2 Índice de Emulsificação	32
3.6.3 Tensão superficial	33
3.7 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	33
3.7.1 Produtividade em biomassa	34
3.7.2 Velocidade específica de crescimento máxima	34
3.7.3 Tempo de Geração	34
3.7.4 Fator de conversão de substrato em biomassa	35
3.8 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE.....	35

3.9 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO.....	36
3.10 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO	36
3.11 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO, RAZÃO DE AERAÇÃO E INDUTOR	37
3.12 TESTE DE REMOÇÃO DE ÓLEO ADSORVIDO EM AREIA.....	37
3.13 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE.....	38
3.14 ESTUDO DA TOXICIDADE	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS	40
4.2 SELEÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE.....	40
4.3 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO.....	43
4.4 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO	51
4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO, RAZÃO DE AERAÇÃO E INDUTOR	56
4.6 TESTE DE REMOÇÃO DE ÓLEO DE MOTOR ADSORVIDO EM AREIA DA PRAIA.....	67
4.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE CULTIVO NA MELHOR CONDIÇÃO	69
4.8 TESTE DE ESTABILIDADE	71
4.9 TESTE DE TOXICIDADE	74
5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, contêm uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, em que a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica, enquanto que a parte apolar é normalmente uma cadeia carbônica. O equilíbrio entre essas duas partes na mesma molécula confere propriedades não usuais, incluindo a habilidade de diminuir a tensão superficial da água (KIM et al., 2000; NITSCHKE e PASTORE, 2002; ARAÚJO et al., 2013).

Como a maioria desses produtos são sintetizados a partir de derivados de petróleo, eles não são biodegradáveis e costumam ser tóxicos. Por essa razão, tem se buscado realizar a sua substituição por compostos de origem biológica, como é o caso dos biossurfactantes, que apresentam inúmeras vantagens quando comparados aos de origem química (BANAT et al., 2014). Como vantagens podem-se destacar a tolerância à temperatura, pH, força iônica; baixa toxicidade, biodegradabilidade, além disso produzem menor tensão superficial com menores concentrações de biossurfactante (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Do ponto de vista microbiológico, pode-se mencionar como vantagem, o fato de haver uma diversidade de microrganismos capazes de sintetizar tais compostos, pois essa capacidade é inerente aos mecanismos de adaptação dos mesmos (FONTES, 2008).

Os biossurfactantes podem ser produzidos por fungos, leveduras ou bactérias, de forma extracelular ou como parte da membrana celular (MULLIGAN, 2004). Os maiores responsáveis pela sua produção são as bactérias e as arqueobactérias (BARROS et al., 2007). A procura por linhagens bacterianas produtoras de surfactantes visa a sua potencial aplicação, dentre outras, em biorremediação e na recuperação avançada de petróleo (SILVA et al., 2003; BATISTA et al., 2017). A utilização de bactérias adaptadas a ambientes com alta temperatura e a elevada concentração de sais é importante uma vez que muitas das aplicações dos biossurfactantes ocorrem nessas condições.

As características estruturais e a capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais fazem com que os biossurfactantes sejam um os produtos mais versáteis em processos químicos. Portanto, apresentam diversas aplicações incluindo em alimentos, cosméticos, agricultura e petróleo (BANAT et al., 2014; DESAI e BANAT, 1997). Ainda podem ter aplicações biológicas devido às suas propriedades fungicidas, bactericidas, inseticidas e anti-virais, bem como uso como agentes anti-adesivo e inibidores enzimáticos (SANTOS et al., 2016).

Uma grande quantidade de substratos pode ser empregada na produção de biossurfactantes, desde hidrocarbonetos até carboidratos. A composição e características dos

surfactantes de origem biológica são influenciadas pela natureza da fonte de carbono e nitrogênio empregadas no processo, além da presença de magnésio, ferro e fósforo no meio de cultivo. Além destes, a temperatura, pH e agitação são fatores de extrema importância e determinarão o tipo, a qualidade e a quantidade de biotensioativo produzido (BANNAT 1995; FONTES et al., 2008).

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas, seu peso molecular e o seu modo de ação. Os biossurfactantes de baixo peso molecular são eficazes na redução de tensões superficiais em interfaces óleo/água. Já os de alto peso molecular, também chamados de bioemulsificantes, são mais eficazes na estabilização de emulsões de óleo em água (BANAT et al., 2010).

Os altos custos associados à produção de biossurfactantes e a utilização de substratos caros têm sido as principais razões pelas quais esses compostos ainda não são amplamente produzidos em escala industrial. O uso de substratos não convencionais, como aqueles provenientes de fontes alternativas de carbono, tem sido promissor possibilitando a redução de até 50% dos custos associados a esse processo (SOUSA et al., 2014).

O Nordeste do Brasil possui uma economia baseada na produção agrícola, o que acarreta no acúmulo de grandes quantidades de resíduos (ARAÚJO, 2013). Vários processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para a utilização desses resíduos agroindustriais na produção de compostos de interesse, tais como enzimas, biocombustíveis, aminoácidos e biossurfactantes.

A utilização desses resíduos, além de agregar valor a produtos que seriam descartados, contribui com o ambiente, uma vez que a destinação desses resíduos muitas vezes é realizada de maneira inadequada (ROSSMANN, 2008; MORAIS 2012). Dessa forma, muitos trabalhos têm buscado fazer o aproveitamento desses materiais para a produção de biossurfactantes a fim de reduzir os altos custos atrelados à sua produção (MAKKAR et al., 2011).

O objetivo desse trabalho foi selecionar linhagens com potencial para produção de biossurfactantes e estudar a produção desses compostos a partir de substratos alternativos, tais como melão, vinhaça, manipueira, polpa de coco e óleo de soja residual.

1.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar bactérias produtoras de biossurfactante e estudar sua produção a partir de substratos alternativos como melão, manipueira, vinhaça, polpa de coco e óleo de soja residual.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

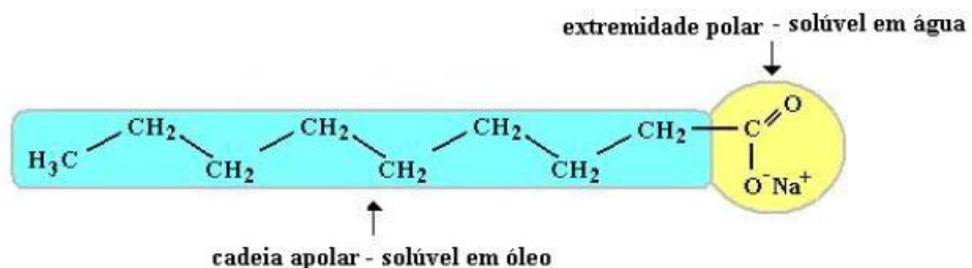
- Fazer a caracterização físico-química dos resíduos que serão usados como substrato;
- Selecionar bactérias quanto à produção de biossurfactantes;
- Avaliar a produção dos biossurfactantes em diferentes resíduos como: melão, manipueira, óleo de soja residual, polpa de coco e vinhaça;
- Avaliar diferentes fontes de nitrogênio: uréia, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de amônio;
- Avaliar as condições de concentração da fonte de nitrogênio, razão de aeração e indutor através do planejamento experimental fatorial 2^3 ;
- Fazer o estudo da cinética de crescimento celular e produção do biossurfactantes nas melhores condições;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactantes obtido em relação à temperatura, pH e salinidade;
- Realizar testes de toxicidade do biossurfactante obtido em *Artemia salina*;
- Realizar testes de remoção de óleo de motor usado adsorvido em areia da praia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SURFACTANTES

Os surfactantes (Figura 1) são constituídos de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica na mesma molécula. Eles são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface, reduzindo, assim a tensão superficial e interfacial dos líquidos (BUENO et al., 2010). Esses compostos têm preferência por interfaces de polaridades distintas e são solúveis em solventes orgânicos (apolar) e aquosos (polares) (LUNA et al., 2013).

Figura 1 - Molécula de surfactante



Fonte: CURBELO (2006)

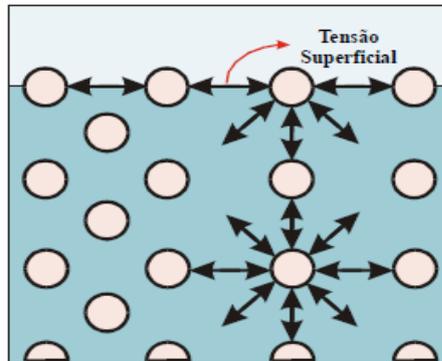
Os líquidos possuem a tendência de adotar uma forma esférica, pois é a forma que apresenta a menor razão superfície/volume. No interior do líquido, as forças coesivas entre as moléculas são compartilhadas com os átomos vizinhos. As que estão na superfície não possuem átomos vizinhos acima delas, e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Assim, a tensão superficial é este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície (PIROLLO, 2006). A Figura 2 mostra a representação das forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido.

Devido à dupla afinidade que existe nas moléculas de tensoativo, quando em baixas concentrações, eles tendem a se orientar com a parte hidrofílica voltada para a fase aquosa e a parte hidrofóbica voltada para o ar ou outra substância que tenha pouca afinidade com a água (CURBELO, 2006).

Os surfactantes podem ser classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar, podendo ser aniônicos (carregados negativamente), catiônicos (carregados positivamente), não iônicos (sem qualquer carga) e anfótero/zwitteriônico (ambas as cargas). Outra característica dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas, favorecendo a mínima carga de energia livre do sistema (BANAT et al., 2000; SINGH et al.,

2007; PACHECO et al., 2010). A menor concentração em que há formação de micelas é denominada de concentração micelar crítica (CMC).

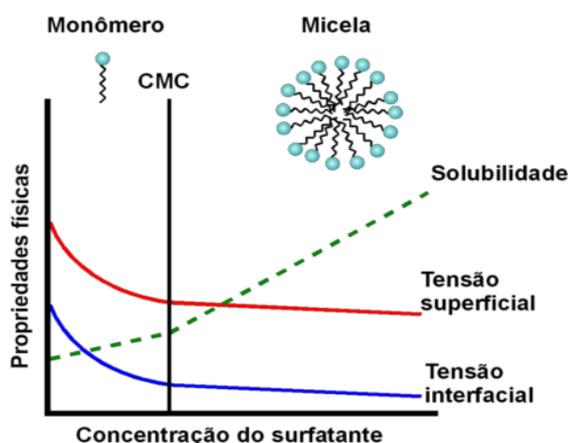
Figura 2 - Forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido



Fonte: PIRÔLLO, 2006.

Quando a concentração do tensoativo está abaixo da CMC, as suas moléculas se encontram principalmente na forma de monômeros e acima da CMC formam agregados moleculares que são chamados de micelas. Acima da CMC, as tensões interfaciais e superficiais não sofrerão mais nenhuma redução (MANIASSO, 2001). O tipo do surfactante e a salinidade são alguns fatores que influenciam essa concentração (MULLIGAN et al, 2001). A Figura 3 mostra como alguns parâmetros variam em função da concentração de surfactante.

Figura 3 - Solubilidade, tensão superficial e tensão interfacial em função da concentração de surfactante



Fonte: LIMA, 2007

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo (NITSHKE e PASTORE, 2002). Mas, a preocupação com questões ambientais associadas às novas legislações de controle ambiental tem pressionado as

indústrias a procurar alternativas que sejam menos danosas ao ambiente, como é o caso dos biossurfactantes, que diminuem o impacto ambiental por serem biodegradáveis (BUENO et al., 2010; BENUTO et al., 2013).

2.2 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são compostos anfífilos de origem biológica contendo uma região hidrofílica e uma hidrofóbica (BANAT et al., 2014). A sua porção hidrofóbica é usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (NITSHKE e PASTORE, 2002; LUNA, 2013).

Os biossurfactantes são produzidos por uma ampla gama de microrganismos, e podem ser liberados de forma extracelular no meio de cultura ou aderidos à célula microbiana, predominantemente durante o crescimento em substratos não miscíveis em água (DESAI e BANAT, 1997). O principal papel fisiológico dos biossurfactantes é permitir que os microrganismos cresçam em substratos insolúveis em água a partir da redução da tensão entre as fases, tornando, assim, os substratos mais disponíveis para absorção e metabolismo (SANTOS et al., 2016).

Os biossurfactantes podem ser emulsionantes. Uma emulsão é um sistema heterogêneo constituído por um líquido imiscível disperso em outro líquido na forma de gotículas, cujo diâmetro geralmente excede 0,1 mm. Existem dois tipos básicos de emulsão: óleo em água (O/A), em que a água é a fase contínua e o óleo a fase dispersa; e água em óleo (A/O), em que o óleo é a fase contínua e a água a fase dispersa. As emulsões têm estabilidade mínima, mas a adição de biossurfactantes pode levar a uma emulsão que permanece estável por meses ou anos (SANTOS et al., 2016).

Kosaric (2001) cita que os biossurfactantes apresentam muitas vantagens quando comparados aos surfactantes quimicamente sintetizados, dentre elas:

- ✓ Baixa toxicidade;
- ✓ Biodegradabilidade; biodigestibilidade e biocompatibilidade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos alimentícios;
- ✓ Possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo;
- ✓ Eficácia em condições extremas de pH, temperatura e salinidade;
- ✓ Utilização em controle ambiental, já que podem ser utilizados de forma eficiente na manipulação de emulsões industriais, controle de derramamento de petróleo,

biodegradação e desintoxicação de efluentes industriais e em biorremediação de solos contaminados.

Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de avaliar a estabilidade dos biossurfactantes em relação a condições extremas de pressão, pH, força iônica e presença de solventes orgânicos. A importância desses estudos reside no fato de diversos processos industriais e ambientais estarem sujeitos a essas condições extremas, por isso, ocorre a necessidade de avaliar o comportamento em relação a essas variáveis para que a sua utilização seja viabilizada (BARROS et al., 2008).

A produção de biossurfactantes pode ser realizada utilizando açúcares e óleos como fontes de carbono adequadas para o cultivo de microrganismos (BUENO et al., 2010). Diversos fatores apresentam influência no tipo, rendimento e qualidade do surfactante biológico produzido (GAUTAM e TYAGI, 2006; CALVO et al., 2009). Além de parâmetros ambientais como pH, temperatura, agitação e nível de CO₂, a produção de biossurfactantes também depende da composição do substrato e da sua concentração no meio. Além disso, a relação entre a composição de carbono e nitrogênio (C/N) desempenha um papel importante no processo de produção (BANAT et al., 2014).

Razões C/N elevadas (isto é, baixos níveis de nitrogênio) limitam o crescimento bacteriano, favorecendo o metabolismo celular para a produção de metabólitos. Em contraste, o excesso de nitrogênio conduz à síntese de material celular e limita o acúmulo de produtos (SANTOS et al., 2016).

2.2.1 Aplicações

Devido às suas características, os biossurfactantes têm potencial de aplicação em áreas industriais como alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, tintas, limpeza, agricultura, biorremediação e recuperação avançada do petróleo (BANAT et al., 2010; RUFINO et al., 2011; EL-SHESHTAWY et al., 2015). Vários biossurfactantes exibem atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, o que os tornam moléculas relevantes para aplicações no combate a muitas doenças e infecções (RUFINO et al., 2011).

A sua aplicação na indústria alimentícia ocorre principalmente devido às suas características de formação e estabilização de emulsões. Os emulsificantes nas aplicações em alimentos são utilizados para promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados (BARROS et al., 2007). Nitschke e Pastore (2002) afirmaram que a emulsificação é importante na formação de textura e

consistência. Os biossurfactantes podem ser aplicados em panificação e produtos derivados de carne, em que influenciam nas características reológicas da farinha e na emulsificação de gorduras.

A contaminação ambiental causada pela atividade industrial é devido à liberação, de forma accidental ou deliberada, de compostos orgânicos e/ou inorgânicos no meio ambiente. A aplicação de biossurfactantes na remediação de compostos orgânicos visa aumentar a biodisponibilidade mobilizando ou removendo os contaminantes por pseudosolubilização e emulsificação em um tratamento de lavagem. A aplicação de biossurfactantes na remediação de compostos inorgânicos, como metais pesados, por outro lado, visa a quelação e remoção de tais íons durante um passo de lavagem, facilitado pelas interações químicas entre os anfifílicos e os íons metálicos (BANAT et al., 2010).

Eles são também aplicados na recuperação melhorada de petróleo por microrganismo (*Microbial enhanced oil recovery- MEOR*). Esse método foi desenvolvido para recuperação de óleos remanescentes nos reservatórios após as operações de recuperação primária e secundária (BANAT et al, 2000). Ele consiste em uma tecnologia de recuperação terciária que utiliza microrganismos e seus produtos metabólitos para recuperação de óleo residual (BANAT, 1995).

Os biossurfactantes podem ser aplicados em diferentes áreas dependendo da função que o mesmo desempenhará. Banat et al. (2000) citam algumas delas como mostrado na Tabela 1.

2.2.2 Microrganismos produtores

Os biossurfactantes podem ser produzidos por fungos, leveduras ou bactérias, de forma extracelular ou como parte da membrana celular (MULLIGAN, 2004). Os maiores responsáveis pela sua produção são as bactérias e as arqueobactérias (BARROS et al., 2007). As bactérias produtoras de biossurfactantes incluem as *Pseudomonas aeruginosa* (mono- e di-ramnolipídios), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (lipopeptídeos, glicolipídeos, etc), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos), *Arthobacter paraffineus*, entre outros (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

Dentre as bactérias, o gênero *Pseudomonas* é conhecido na literatura pela habilidade de produzir grandes quantidades de glicolipídeos, que são classificados como ramnolipídeos de baixa massa molecular e apresentam propriedades surfactantes excelentes (SILVA et al., 2014).

Tabela 1 - Potenciais funções e campos de aplicação dos biossurfactantes

Função	Campo de aplicação
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas e aditivos
Solubilizantes e microemulsões	Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura e produtos de alta tecnologia
Agentes espumantes	Produtos de higiene pessoal, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Potenciadores de crescimento microbiano	Tratamentos de lodo de esgoto para resíduos oleosos
Desemulsificantes	Tratamento de resíduos
Agentes redutores de viscosidade	Transporte por oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcáreo-água
Agentes de recuperação de recurso	Recuperação terciária de petróleo

Fonte: BANAT et al., 2000.

Costa et al. (2006) estudaram a produção de ramnolipídios pela *Pseudomonas aeruginosa* LBI, utilizando como fontes de carbono os óleos de Buriti (*Mauritia flexuosa*), Cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), Maracujá (*Passiflora alata*), Andiroba (*Carapa guianensis*), Castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) e Babassu (*Orbignya spp.*). Foram obtidas tensões superficiais entre 29,8 e 31,5 mN/m, concentração micelar crítica de 55 a 163 mg/L e uma atividade emulsificante de 93-100% com tolueno e de 70-92% com querosene.

Ciapina (2008) estudou a produção de biossurfactante por uma linhagem de *Rhodococcus erythropolis* e verificou o seu efeito na biodegradação de uma borra oleosa. O biotensoativo bruto obtido reduziu a tensão superficial da água para $43,4 \pm 2,1$ mN/m, a tensão interfacial para $13 \pm 2,1$ mN/m. Além disso foi obtida uma atividade emulsificante de

66% e CMC de 0,42 g/L. O biossurfactante produzido mostrou potencial na biodegradação da borra oleosa quando aplicado em concentrações menores que a concentração micelar crítica.

Bueno et al. (2010) estudaram a produção de biossurfactante em caldo de fermentação utilizando *Bacillus pumilus* isolada de solo contaminado com hidrocarboneto. Foram testados diferentes pHs (5,0; 6,0; 7,0; 8,0), tempo de fermentação (48, 72 e 96 h) e diferentes fontes de carbonos como glicose, sacarose, manitol, frutose, glicose + frutose e caldo de cana nas concentrações de 1 a 5%. Foram realizados testes de degradação do óleo e determinação de atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram que pH 5,0 e 7,0, 72 horas de fermentação, a sacarose e o suco da cana de açúcar (2%) apresentaram melhores rendimentos. A linhagem foi capaz de degradar o petróleo bruto e exibiu atividade bacteriostática e fungistática.

Decesaro et al. (2013) estudaram a produção de biossurfactante por microrganismos isolados de solo contaminado com diesel. O meio utilizado era composto de extrato de levedura (10 g/L), sulfato de amônio (5g/L), fosfato de potássio (5 g/L), sulfato de magnésio (0,5 g/L) e 1% de óleo diesel como indutor da produção de biossurfactantes. Foi realizado um estudo para avaliar a influência de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e a concentração e tipo de indutor. Os microrganismos que apresentaram os melhores resultados foram identificados como sendo do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*. Esses surfactantes foram capazes de reduzir as tensões superficiais para 39 e 34 mN/m, respectivamente. As maiores produções de biossurfactantes foram obtidas utilizando 1% de óleo de soja como indutor e sem adição de sulfato de amônio na composição do meio utilizado.

2.2.3 Classificação

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas, seu peso molecular e o seu modo de ação (BANAT et al., 2010). Os biossurfactantes de baixo peso molecular são bem conhecidos por reduzir a tensão superficial e a tensão interfacial entre o óleo e a água e, assim, aumentar a recuperação do óleo. Já os biossurfactantes de alto peso molecular, também chamados de bioemulsificantes, como o emulsan, são conhecidos por suas propriedades emulsificantes e, assim, aumentam a mobilidade de óleos pesados e sua recuperação (BANAT et al., 2010; AL-WAHAIBI et al., 2014).

Os biotensoativos são classificados em cinco classes baseadas na sua estrutura química e origem microbiana em glicolipídeos; lipopeptídeos ou lipoproteínas; fosfolipídeos e ácidos graxos; surfactantes poliméricos; surfactantes particulados (DESAI e BANAT, 1997;

GAUTAM e TYAGI, 2006; ARAÚJO et al., 2013). As principais classes de biossurfactantes e os respectivos microrganismos produtores estão apresentados na Tabela 2.

Os glicolípídeos são constituídos por carboidratos e uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos (DESAI E BANAT, 1997). Dentre os glicolípídios mais conhecidos, encontram-se os ramnolípídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, os trealolípídios produzidos por espécies de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium sp.*; e os soforolípídios, produzidos principalmente por leveduras *Torulopsis bombicola*, *T. pehophilum* e *T. apícola* (FARIA, 2010).

Os ramnolípídeos se apresentam como uma atrativa classe de biossurfactantes, porque podem ser produzidos em meios de cultivo contendo tanto hidrocarbonetos quanto carboidratos como única fonte de carbono (DESAI e BANAT, 1997; FARIA, 2010). Eles são constituídos de uma ou duas moléculas de ramnose na porção hidrofílica e uma ou duas cadeias lipídicas na porção hidrofóbica (SILVA, 2014). Esses biossurfactantes são utilizados em aplicações industriais, incluindo alimentícia, farmacêutica, cosméticos e biorremediação (VATSA et al.,2010).

Os lipopeptídeos são biossurfactantes conhecidos pelo seu papel crucial na recuperação de petróleo melhorada por microrganismo (MEOR), além de serem capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre óleo e água (LIANG et al.,2017). A surfactina, um dos biossurfactantes mais poderosos, é um biossurfactante de tipo lipopeptídeo que é formado por várias linhagens do microrganismo Gram-positivo, *Bacillus subtilis* (CHEN et al., 2015).

Grandes quantidades de surfactantes do tipo ácidos graxos e fosfolípídeo são produzidas por várias bactérias e leveduras quando crescidas em n-alcanos (DESAI e BANAT, 1997). Os fosfolípídios são formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos, por meio de ligações éster, e a um grupo fosfato que pode apresentar diferentes substituintes (VALPUESTA, 2008).

Os biossurfactantes poliméricos são constituídos de carboidratos, proteínas, lipídios bem como da mistura desses compostos (MAIER, 2003). Esse tipo de biossurfactante propicia a formação de emulsões estáveis devido a sua alta afinidade por interfaces óleo/água (VALPUESTA, 2008). Os biossurfactantes poliméricos mais estudados são o emulsan e liposan. Emulsan consiste em um eficaz agente emulsificante para hidrocarbonetos em água e é produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* (DESAI e BANAT, 1997). A levedura *Candida lipolytica* é conhecida como produtora do bioemulsificante liposan (BANAT et al., 2010; RUFINO et al., 2014).

Tabela 2 - Principais classes de biossurfactantes e os microrganismos envolvidos

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeo	
-ramnolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídeo	<i>Torulopsis bombicola. T. apicola</i>
-treololipídeo	<i>Rhodococcus erythropolis,</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
-Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
-Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
-Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
-Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
-Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
-Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
-Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Células	Várias bactérias

Fonte: DESAI e BANAT, 1997.

2.3 UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS

A grande quantidade de resíduos industriais gerados diariamente despertou o interesse de pesquisadores na utilização desses resíduos como substratos alternativos para a

produção de compostos de interesse industrial (DATTA et al., 2011; ELLAZZAZZY et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Embora os biossurfactantes apresentem inúmeras vantagens como biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa estabilidade, os custos associados a sua produção ainda são altos. O emprego de substratos de baixo custo, a utilização de condições ótimas de processo e seleção de linhagens com alta capacidade de produção são alternativas para reduzir os altos custos associados à síntese de biossurfactantes (RAZA et al., 2016). Para isso é necessário fazer a seleção do resíduo adequado, que seja capaz de fornecer o equilíbrio certo de nutrientes e que possibilite o crescimento celular e a acumulação de produtos. Resíduos como melaços, substâncias amiláceas, óleos residuais, soro de leite lácteo, resíduos de destilaria e gorduras animais foram relatados e revisados por vários pesquisadores (MAKKAR et al., 2011).

2.3.1 Óleo de soja residual

Os óleos vegetais são principalmente compostos de ácidos graxos saturados ou insaturados com cadeia de 16-18 átomos de carbono e constituem uma fonte de carbono lipídico (MAKKAR et al., 2011). O grande interesse no uso de óleos residuais de fritura na transformação microbiana se deve ao grande problema que é o seu descarte, que acarreta em diversos problemas ambientais (VEDARAMAN e VENKATESH, 2011; ELLAZZAZZY et al., 2014). Diversos pesquisados têm utilizado uma variedade de óleos vegetais, como os de canola, milho, girassol, azeite, semente de uva, palma, coco e soja (MAKKAR et al., 2011).

A produção e consumo de óleos vegetais, em especial o de soja, é muito grande no Brasil, o que acarreta em grandes quantidades de resíduos, que podem ser muito danosos ao meio ambiente (BUENO, 2014). Quando o óleo de fritura atinge corpos d'água é degradado pelos microrganismos presentes, que nesse processo consomem o oxigênio dissolvido presente, acarretando na morte da fauna aquática. No solo, o óleo pode causar proliferação indesejável de microrganismos, fermentação e até danos ao sistema radicular de plantas, em caso de grandes volumes. A biotransformação dos resíduos de óleos vegetais pode ser tomada como uma solução para esse problema (BUENO, 2014).

Vários substratos de baixo custo, como o óleo de soja, não apenas atuam como nutrientes para o crescimento microbiano, mas também atuam como uma importante fonte de isolamento de potenciais microrganismos produtores de biossurfactantes (BANAT et al., 2014).

Lima (2007) investigou a produção de biossurfactante por diferentes linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando óleo de soja residual proveniente da fritura de diversos

alimentos como fonte de carbono. Foram testadas as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* isolada do *Landfarming* Redu (PALR) e a *Pseudomonas aeruginosa* PALC, isolada de solo de uma lagoa contaminada com hidrocarbonetos. As *P. aeruginosa* PALR, ATCC 9027 e a PALC foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio de 62 dinas/cm \pm 1 para 33,9; 28 e 26 dina/cm, produzir em g/L 0,25; 0,77 e 1,39 de raminose, com índice de emulsificação de 60, 100 e 100%, respectivamente. A *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC apresentou maior potencial sendo os melhores resultados com 22 g/L de óleo de soja residual, 5,625 g/L de nitrato de amônio e 11,5 g/L de levedura cervejeira residual. A maior concentração obtida de ramnose, após 48 horas de fermentação, foi 2,3 g/L com índice de emulsão de 100%.

2.3.2 Melaço de cana

O melaço de cana é um subproduto da indústria açucareira, que consiste em água, açúcares totais, colóides suspensos, metais pesados, vitaminas, compostos nitrogenados, entre outros (LIU et al., 2008). A sua ampla utilização como substrato para a produção de compostos orgânicos e bioquímicos se deve ao seu baixo custo quando comparado a outras fontes de açúcar, além de ser rico em outros nutrientes além da sacarose (LIU et al., 2008; MAKKAR, 2011; RAZA et al., 2016). Ele é utilizado na fermentação para produção de etanol, como matéria prima na fermentação de rum, cachaça e fermentos biológicos. É uma interessante alternativa para produção de biossurfactantes (OLIVEIRA, 2014).

Almeida et al. (2017) investigaram a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* UCP0996 utilizando resíduos industriais como substrato. Foi realizado um planejamento experimental e o melhor resultado foi obtido com um meio contendo 2,5% de melaço, 2,5% de milhocina, 2,5 % de óleo de fritura residual e com 2% de inóculo. A tensão superficial do meio foi reduzida para 29,98 mN/m e o rendimento alcançado foi de 4,19 g/L.

Rocha (2017) investigou a produção do biossurfactante do tipo surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como fonte de carbono. O microrganismo foi cultivado em meio formulado com 4% de melaço de cana, o qual foi submetido à fermentação submersa em incubador rotativo (shaker). Dentre os resultados encontrados, na melhor condição de cultivo (200 rpm, 36 °C e razão de aeração de 0,4) foram obtidos 199,45 \pm 0,13 mg/L de surfactina em 24 h, fator de conversão de substrato em produto (YP/S) de 0,022 g/g e produtividade em produto (PP) de 8,19 mg/L.h em 24 h. A Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido na melhor condição de cultivo foi de 20,73 mg/L e o índice de emulsificação para querosene após 24h foi 62%.

2.3.3 Vinhaça

Durante a produção do etanol são gerados grandes volumes de vinhaça, principal resíduo da destilação do vinho. Ela é um efluente líquido constituído principalmente de matéria orgânica e em menor quantidade por potássio, cálcio, enxofre, magnésio e outros minerais (SILVA et al., 2007; ARIMI et al., 2014; MUTTON et al., 2015). É caracterizada como efluente de destilarias e possui alto poder poluente e alto valor fertilizante. A vinhaça é aplicada no processo de fertirrigação da cana-de-açúcar, em substituição parcial ou total à adubação mineral (FREIRE e CORTEZ, 2000; AZANIA et al., 2004; SILVA et al., 2007; SILVA, 2012). A sua aplicação como fertilizante é questionável devido a algumas características como o seu pH ácido, cor escura e outras substâncias químicas que podem levar à contaminação das águas subterrâneas e da compactação do solo (ARIMI et al., 2014; MUTTON et al., 2015).

O aproveitamento desse resíduo para utilização em processos fermentativos além de solucionar problemas ambientais, possibilita a produção de compostos de interesse industrial como é o caso dos biossurfactantes.

Figueiredo (2016) fez um estudo da produção de biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos agroindustriais como substrato, dentre eles a vinhaça e a manipueira. As condições de cultivo utilizadas foram 28°C, 155 rpm por 72 horas. Foi realizado um planejamento experimental para estudar as melhores concentrações da mistura entre vinhaça e manipueira, e o melhor resultado de tensão superficial foi de 27,49 mN/m, utilizando no meio 4% de vinhaça e 27,05% de manipueira. Em relação ao índice de emulsificação o melhor resultado foi de 94,29%, em óleo de girassol, utilizando 3% de vinhaça e 25% de manipueira na composição do meio.

2.3.4 Manipueira

Substratos à base de amido também constituem fontes de carbono renováveis. A manipueira, que é um resíduo rico em carboidratos, gerado em grandes quantidades, já foi utilizada para a produção de surfactina por *B. subtilis* (SANTOS et al., 2016).

A manipueira, resíduo líquido gerado nas indústrias de processamento de mandioca, embora seja altamente poluente, devido à sua alta concentração de compostos orgânicos e presença de cianeto, podem ser considerados um resíduo rico em nutrientes, o que o torna passível de ser utilizado no desenvolvimento de microrganismos (DAMASCENO et al., 1999; ROCHA, 2007).

Barros et al. (2008) estudaram a estabilidade de um biossurfactante produzido pela linhagem LB5a de *Bacillus subtilis*, cultivado em manipueira em um processo piloto. A manipueira pré-tratada foi utilizada como substrato em fermentação em biorreator de 80L (escala piloto). As condições do processo foram 35°C, 20L/hora de aeração e agitação de 150 rpm. O biossurfactante produzido mostrou uma excelente atividade tensoativa, reduzindo a tensão superficial da água de 72,31 para 27,01 mN e apresentou uma CMC de 12 mg/L. Os resultados mostraram que o biossurfactante foi estável à temperatura de 100°C por 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos, à concentração de 2,5 a 20% de NaCl e na faixa de pH de 6 a 10. Além disso, exibiu altos valores de índice de emulsificação para vários hidrocarbonetos cíclicos e alifáticos, além de óleos vegetais com diferentes perfis de ácido graxo.

2.3.5 Polpa de Coco

A grande demanda por água coco acarreta na produção de elevadas quantidades de resíduos em locais como praias onde o seu consumo é frequente. Embora a polpa de coco verde seja comestível, normalmente apenas a água é extraída do coco fresco. A polpa madura é utilizada tanto para cozinhar quanto para processamento industrial, mas as imaturas, assim como a casca, são consideradas como descarte (SANTANA et al., 2011).

A formação da polpa tem início partir de mais ou menos o quinto mês. Nesse período, a polpa tem uma consistência gelatinosa. A polpa começa a ficar mais consistente conforme o fruto amadurece até que fica rígida ao atingir a maturação completa por volta do décimo segundo ao décimo terceiro mês (BRITO, 2004; SANTANA, 2012).

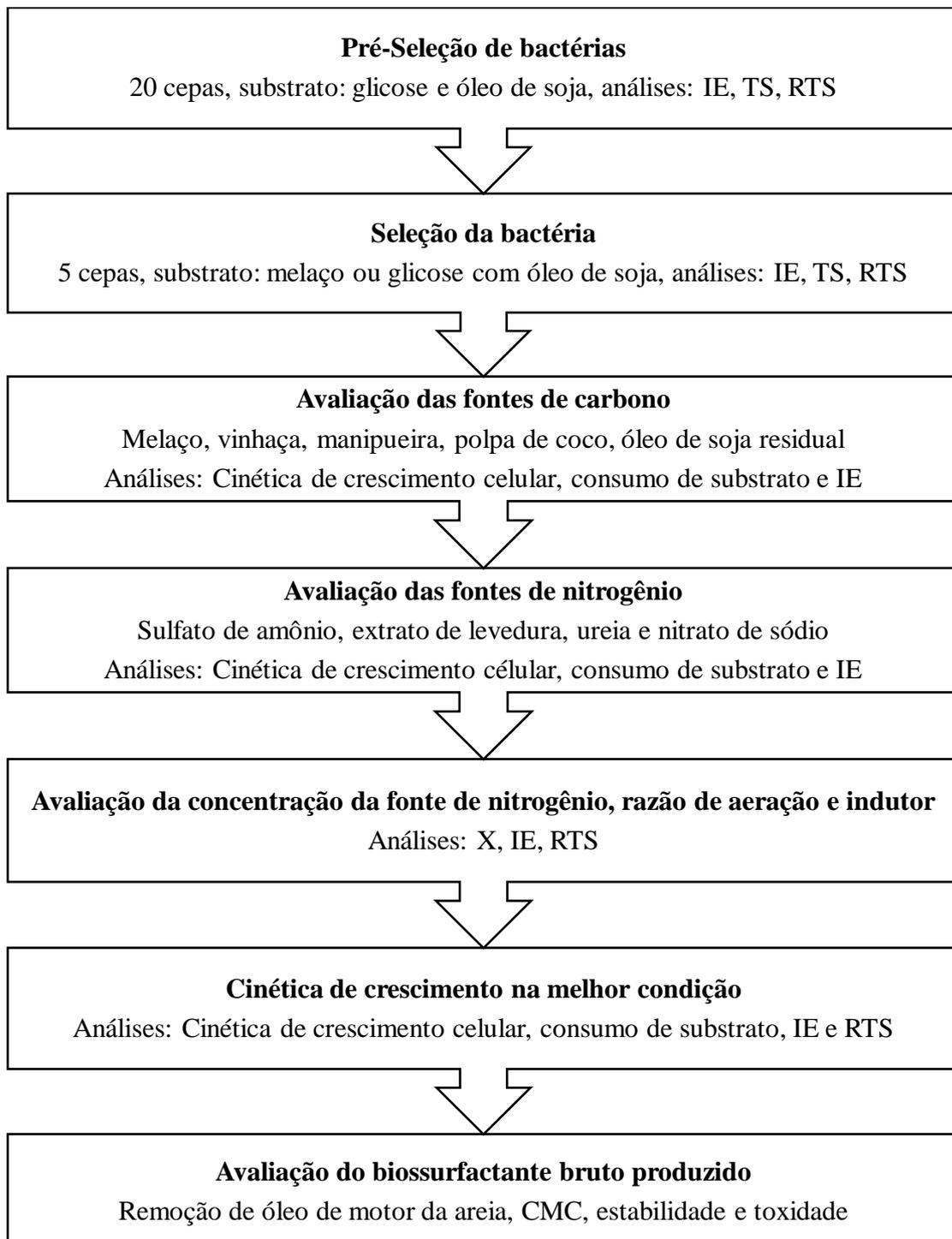
A polpa do coco ou albúmen sólido é constituído principalmente de carboidratos, proteínas e lipídeos (SANTANA, 2012), o que torna possível a sua aplicação em processos fermentativos para obtenção de compostos de interesse industrial.

Os resíduos citados são abundantes na região Nordeste e são ricos em diversos nutrientes, o que os torna viável na utilização em processos fermentativos para obtenção de produtos de interesse industrial. Além disso, os resíduos como a manipueira e óleo de soja residual são altamente poluentes, podendo acarretar em inúmeros danos ao ambiente. O emprego desses resíduos além de reduzir os custos associados ao processo colaboram na redução de problemas ambientais.

3 METODOLOGIA

Na Figura 4 está apresentado o fluxograma com as etapas desenvolvidas na realização desse trabalho, sendo IE o índice de emulsificação, TS a tensão superficial final, RTS o percentual da redução da tensão superficial, X a concentração celular e CMC a concentração micelar crítica.

Figura 4 - Metodologia do procedimento experimental



3.1 RESÍDUOS UTILIZADOS

Os resíduos usados foram melaço, vinhaça, manipueira, polpa de coco e óleo de soja residual.

O melaço e a vinhaça foram provenientes da safra 2016/2017 da Usina Monte Alegre localizada no município de Mamanguape-PB. A manipueira utilizada foi cedida pela Cooperativa de casas de farinha de mandioca de Vitória da Conquista, situada na Bahia. O óleo de soja residual de fritura, utilizado como indutor nos cultivos, foi cedido por um restaurante localizado na Universidade Federal da Paraíba.

Os resíduos de coco foram cedidos por um comerciante de água de coco da praia de Cabo Branco, localizado na cidade de João Pessoa. A polpa foi extraída do interior do coco verde e processada em liquidificador. A polpa do coco estava com diferentes estágios de maturação, alguns com um aspecto gelatinoso e outros mais consistentes. Como a textura obtida não estava adequada para a utilização em fermentação submersa a polpa do coco foi processada com água em uma proporção de 1:1, em seguida filtrada e congelada para posterior utilização, conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Polpa de coco (A) após o primeiro processamento; (B) após o processamento com água em uma proporção de 1:1; (C) depois de filtrada



3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS

Os resíduos utilizados foram caracterizados quanto ao pH, Brix, Açúcares Redutores, Açúcares Redutores Totais e Lipídios.

3.2.1 pH

A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinado através de medidas diretas em um pHmetro digital, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.2.2 ° Brix

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado em um refratômetro digital de bancada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.2.3 Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais

Para determinar a quantidade de açúcares redutores utilizou-se o método de DNS, proposto por Miller (1959) e adaptado por Vasconcelos (2013).

3.2.4 Lipídios

A determinação do teor de lipídios totais foi realizada utilizando a metodologia de Folch et al. (1957), em que foi utilizado uma mistura dos solventes clorofórmio e metanol (2:1) para realizar a extração. A quantificação foi realizada por gravimetria.

3.3 MICRORGANISMOS

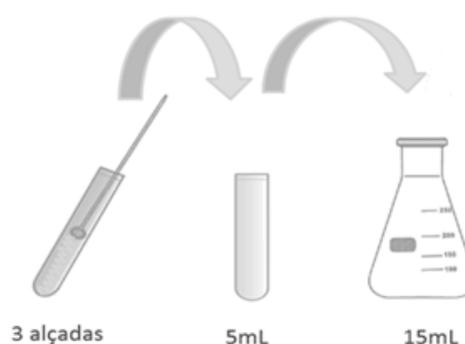
Foram analisadas bactérias isoladas e gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Teresa Cristina Soares de Lima Gris do Centro de Biotecnologia, provenientes do solo e do resíduo agroindustrial denominado de torta de filtro da Usina Japungu S/A, localizada na cidade de Santa Rita – PB.

Ao todo foram 20 linhagens, sendo 12 provenientes da torta de filtro: JTF1, JTF2, JTF3, JTF4, JTF6, JTF7, JTF14, JTF15, JTF17, JTF19, JTF20 e JTF21, e 8 provenientes do solo: JS2, JS10, JS11, JS15, JS18, JS19, JS20 e JS21. As culturas foram mantidas em meio Ágar Nutriente (NA), composto por Ágar (15 g/L), Peptona (5 g/L), Extrato de levedura (1,5 g/L), Cloreto de Sódio (5 g/L) e Extrato de carne (1,5 g/L). Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a 37°C por 24h e posteriormente mantidos sob refrigeração a 4°C.

3.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo para um tubo de ensaio com 5 mL do meio proposto por Santa Anna et al. (2002), apresentado na Tabela 3, acrescido do substrato selecionado e incubado em mesa agitadora a 35°C e agitação de 200 rpm por 18h. Passado esse tempo, os 5 mL foram transferidos para um erlenmeyer contendo 15 mL do mesmo meio e incubado nas mesmas condições por 24h, conforme o esquema mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema ilustrativo do processo de propagação do inóculo



Fonte: adaptado de SILVA (2016)

3.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

A produção de biossurfactantes ocorreu por meio de um processo de fermentação submersa, em que foram utilizados frascos erlenmeyers de 300 mL, com 200 mL de meio, dos quais 10% v/v foram de inóculo. O meio base utilizado para a realização dos cultivos foi proposto por Santa Anna (2002), apresentado na Tabela 3, modificando apenas a fonte de carbono.

O meio de cultura foi esterilizado a 1 atm e 121°C por 15 minutos e inoculado com uma concentração de células de 10% (v/v). Após isso, os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora *shaker* a 35°C e agitação orbital de 200 rpm. O processo fermentativo durou de 72 a 96h. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e sob as mesmas condições de temperatura, agitação e concentração de inóculo.

3.6 ANÁLISES

Amostras periódicas foram retiradas ao longo do cultivo para análise da concentração de células através de medidas de absorvância ($\lambda=600\text{nm}$) e peso seco, dos açúcares redutores totais, do pH do índice de emulsificação e da tensão superficial.

As análises de pH e açúcares redutores totais foram realizadas conforme itens 3.2.1 e 3.2.3, respectivamente.

3.6.1 Determinação do Crescimento Celular

3.6.1.1 Método da turbidimetria

Para a determinação do crescimento celular foi utilizado o método da turbidimetria. Para isso foram realizadas medidas da densidade óptica das amostras por meio de um espectrofotômetro na faixa do visível a um comprimento de onda de 600nm. Para a determinação da concentração celular em g.L^{-1} foi construída uma curva de calibração que correlacionava a absorvância do meio ao peso seco da amostra (VELOSO, 2007).

3.6.1.2 Método do peso seco

Para a obtenção do peso seco da amostra foi retirada uma alíquota de 2mL da suspensão de células obtida ao final do cultivo, colocada em tubo previamente seco e pesado, e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi seco em estufa a 80°C por 24h. Após isso, o tubo foi resfriado em dessecador por 15 min e pesado. Esse procedimento foi realizado em quintuplicata. A concentração em g.L^{-1} da amostra é dada pela razão da massa final (seca) em g dividido pelo volume de amostra em L.

3.6.2 Índice de Emulsificação

Para determinação do índice de emulsificação foi tomada uma alíquota de 2 mL do sobrenadante livre de células obtido ao final do cultivo, transferiu-se essa amostra para um tubo de ensaio e acrescentou-se 2 mL de um composto hidrofóbico (óleo de motor, óleo de soja ou querosene). Os tubos foram agitados por 2 minutos em agitador do tipo vórtex, em seguida foram deixados em repouso por 24h. O índice de emulsificação foi calculado pela

razão da altura da camada emulsificada (HE em mm) e altura total (HT em mm) e multiplicada por 100, conforme a Equação 1 proposta por Cooper e Goldenberg (1987).

$$IE_{24} = \frac{HE}{HT} * 100 \quad (1)$$

3.6.3 Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada por meio de medidas diretas em um tensiômetro digital Sensadyne Tensiometer modelo QC6000, do Laboratório de Petróleo da Universidade Federal da Paraíba. O funcionamento desse equipamento se baseia no método da pressão máxima da bolha, em que é bombeado um gás inerte (nitrogênio) através de dois capilares de diâmetros diferentes. O bombeamento desse gás por meio desses dois capilares gera um diferencial de pressão (ΔP) que é proporcional a tensão superficial do fluido (CURBELO, 2006; SANTOS et al., 2007; TEIXEIRA, 2012). A Equação 2 mostra essa relação.

$$\Delta P = P1 - P2 = \left(\rho gh + \frac{2\gamma}{r1} \right) - \left(\rho gh + \frac{2\gamma}{r2} \right) = \frac{2\gamma}{r1} - \frac{2\gamma}{r2} \quad (2)$$

Em que P1 é a pressão exercida pelo capilar de diâmetro menor, P2 é a pressão exercida no capilar de diâmetro maior, g é aceleração gravitacional, h é a altura dos capilares, ρ é a densidade do líquido e γ a tensão do líquido, r é o raio do capilar de menor diâmetro e r2 o raio do capilar de maior diâmetro (TEIXEIRA, 2012).

Parte das análises de tensão superficial foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pelo técnico do laboratório em tensiômetro modelo Phoenix 150-SEO (Surface Electro Optica), devido a problemas apresentados pelo tensiômetro do laboratório de petróleo da UFPB. O tensiômetro utilizado funciona pelo método da gota pendente, em que a determinação da tensão superficial é realizada por meio de uma avaliação do perfil da gota.

3.7 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

A obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento foi realizada segundo o proposto por SCHMIDELL et al. (2001).

3.7.1 Produtividade em biomassa

Expressa a velocidade média do crescimento microbiano, onde se verifica a quantidade de células produzida ao longo do tempo de cultivo. Onde, X é a concentração final de células e X_0 é a concentração inicial e t é o tempo de cultivo em h. O cálculo é realizado conforme a Equação 3.

$$P_x = \frac{X - X_0}{t} \quad (3)$$

3.7.2 Velocidade específica de crescimento máxima

A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo e constante na fase exponencial da curva de crescimento, onde a ação do metabolismo do microrganismo se dá de forma mais acentuada e efetiva. A velocidade corresponde à inclinação da reta obtida pelo gráfico do $\ln(X)$ versus T (tempo de cultivo), na fase exponencial, conforme a Equação 4.

$$\ln X = \mu_{m\acute{a}x}(T - T_i) + \ln X_i \quad (4)$$

Em que X é a concentração celular, $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica máxima de crescimento, T é o tempo final e T_i é o tempo inicial.

3.7.3 Tempo de Geração

O tempo de geração permite mensurar a que tempo a concentração de microrganismo irá dobrar do seu valor inicial. Na fase de crescimento exponencial o tempo de geração é constante. O mesmo é calculado pela Equação 5. Sendo T_g o tempo de geração e $\mu_{m\acute{a}x}$ a velocidade específica máxima de crescimento,

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

3.7.4 Fator de conversão de substrato em biomassa

É a relação estabelecida entre a concentração de células produzida e a concentração de substrato consumido. De modo que se verifica a influência de um sob o outro. Dado pela Equação 6, onde $Y_{x/s}$ é o fator de conversão de substrato em biomassa, X é a concentração final de células, X_0 é a concentração inicial de células, S_0 é a concentração inicial de substrato e S a final.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

3.8 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE

Para a seleção das linhagens isoladas da Usina Japungu foram realizados cultivos com o meio proposto por Santa Anna (2001) e usando como fonte de carbono 10 g/L de glicose, suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual, e análise dos resultados de redução da tensão superficial e do índice de emulsificação após 96h de cultivo. A composição do meio utilizado está mostrada na Tabela 3. As análises de tensão superficial foram realizadas na UFPB.

As linhagens selecionadas foram submetidas a um novo processo fermentativo sob as mesmas condições, modificando apenas a fonte de carbono para o melão em uma concentração de 10 g/L de açúcares redutores suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual, com a finalidade de selecionar a melhor bactéria produtora de biossurfactantes. Foram também realizados cultivos com esses mesmos 5 microrganismos, utilizando a combinação de melão com o óleo residual, mas sem a adição de sais.

Tabela 3 - Composição do meio

Composição	Concentração (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	3,0
K ₂ HPO ₄	7,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Fonte de carbono	variável

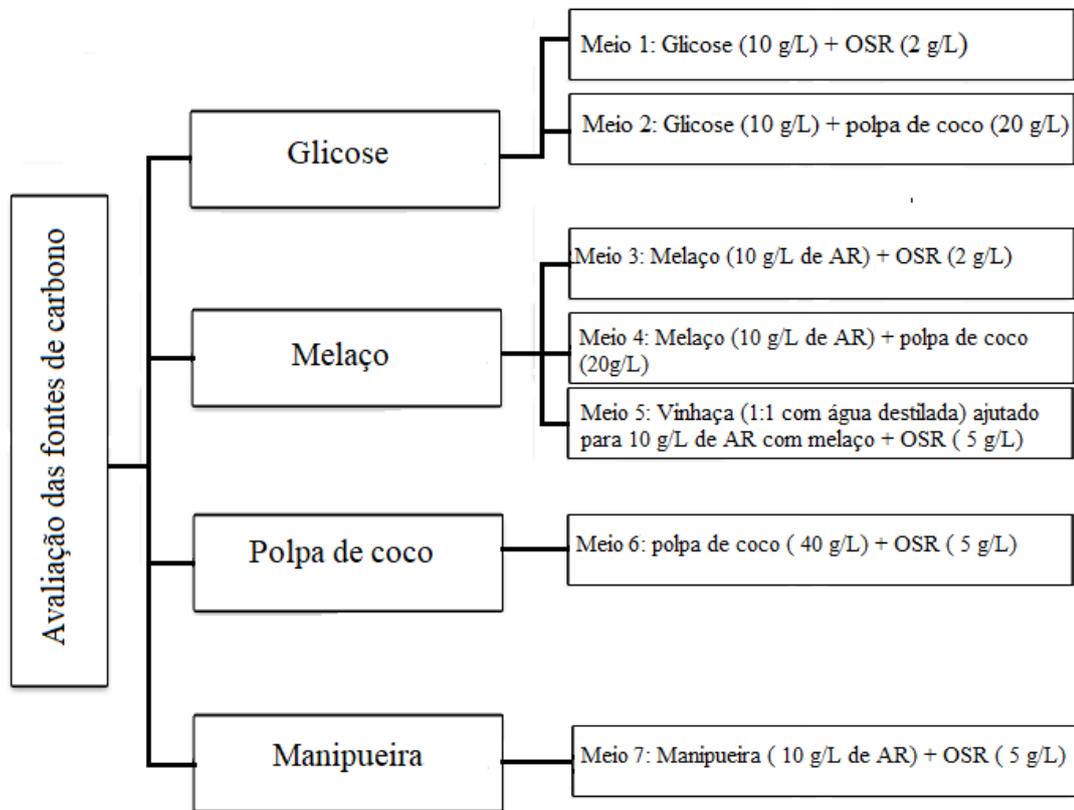
Fonte: Adaptado de SANTA ANNA (2001).

3.9 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO

As avaliações das fontes de carbono foram conduzidas utilizando a bactéria que apresentou o maior potencial na produção de biossurfactantes. Para isso foram realizados cultivos utilizando o mesmo meio selecionado, fazendo apenas substituições na fonte de carbono. Na Figura 7 estão apresentadas as composições dos sete meios formulados.

Desses ensaios foi avaliada a cinética de crescimento do microrganismo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata sob as mesmas condições de temperatura, agitação e concentração de inóculo.

Figura 7 - Composição dos meios formulados para avaliação das fontes de carbono



3.10 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO

Foram realizados testes em relação às fontes de nitrogênio com a bactéria selecionada, em um meio utilizando melaço com 10 g/L de AR como fonte de carbono, suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual. As fontes de nitrogênio foram: ureia, extrato de levedura e nitrato de sódio em uma concentração de 1 g/L, e comparados com os

resultados obtidos com sulfato de amônio, que é a fonte de nitrogênio utilizada originalmente no meio proposto por Santa Anna (2001).

3.11 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO, RAZÃO DE AERAÇÃO E INDUTOR

Para analisar a influência dos fatores concentração de sulfato de amônio; razão de aeração, definida como sendo a razão entre o volume de meio (100, 150 e 200 mL) e volume do frasco (300 mL); e do indutor, foi realizado um planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central. Como indutor foram utilizado polpa de coco e óleo de soja residual (OSR). O planejamento foi avaliado utilizando o programa Statistica 7.0. Na Tabela 4 estão apresentados os níveis e os fatores estudados.

Tabela 4 - Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental

	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
1	Concentração de sulfato de amônio (g/L)	1	2	3
2	Razão de aeração ($V_{\text{meio}}/V_{\text{frasco}}$)	0,33	0,5	0,67
3	Indutor (g/L)	Coco (20)	Coco (10) + OSR(2,5)	OSR (5)

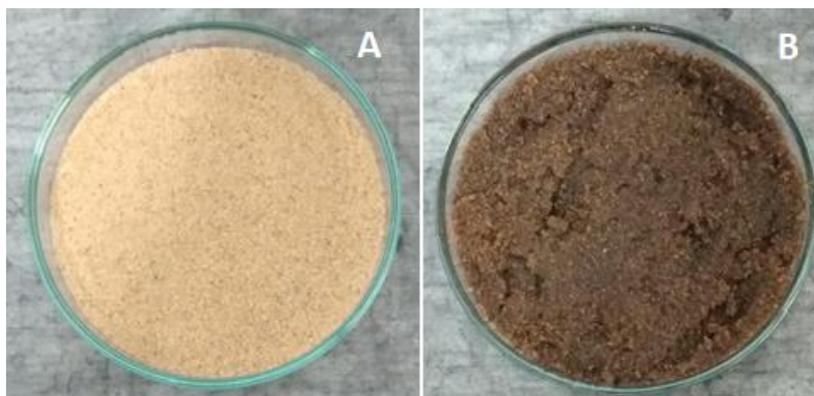
Os cultivos foram realizados nas mesmas condições do Item 3.6, usando melaço com 10g/L de AR. O cultivo teve duração de 72 horas, sendo o caldo bruto obtido analisado quanto à concentração final de células por peso seco, IE e redução da tensão superficial.

Na melhor condição encontrada foi realizado cultivo para analisar a cinética de crescimento celular e consumo de substrato. Os cultivos foram realizados em duplicata. O caldo bruto obtido foi utilizado para realizar a capacidade de remoção de óleo em areia, estabilidade ao pH, temperatura e salinidade bem como o teste de toxicidade.

3.12 TESTE DE REMOÇÃO DE ÓLEO ADSORVIDO EM AREIA

O teste foi conduzido com areia coletada da praia (Figura 6 – A) seca em estufa por 24h. Amostras de 50g de areia foram contaminadas com 10g de óleo de motor usado e deixadas para adsorver por um período de 5 dias (Figura 6 – B)

Figura 8 - Areia antes da adsorção (A) e depois da adsorvida com óleo de motor usado por 5 dias (B)



Depois de adsorvida, amostras de 5g da areia contaminada foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL, adicionando-se 25 mL de água destilada (controle), 25 mL do caldo fermentado após 72h de cultivo com e sem células ou uma solução do tensoativo tween 80. Os erlenmeyers foram incubados em shaker a 35°C e 200 rpm por 24h, em seguida a areia foi separada da solução e seca em estufa a 60°C por 2h. O percentual de remoção de óleo da areia foi determinado pela metodologia de Folch et al. (1957), que consiste em extrair os lipídios da amostra com uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1), em seguida, quantificar por gravimetria. A metodologia utilizada foi uma adaptação das metodologias utilizadas por Melo (2005), Luna e Sarubbo (2009) e Silva (2016).

3.13 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE

Foi realizado o estudo do efeito de diferentes níveis de salinidade, pH e temperatura no caldo metabólito livre de células após a centrifugação por 15 minutos. Para avaliar a influência da temperatura, o caldo bruto foi levado à autoclave por 15 minutos a 100°C e a 120°C (ROCHA et al., 2007). Para a salinidade foram usadas concentrações de NaCl de 0 a 14% massa/volume (XIA et al., 2012). Foram testados pH 3,5, 6, 8 e 10 ajustados com soluções de HCl (2N) e NaOH (1N) (ILORE et al., 2005). Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por meio da determinação do índice de emulsificação e da tensão superficial.

3.14 ESTUDO DA TOXICIDADE

A toxicidade do biossurfactante foi realizada com o caldo metabólito livre de células utilizando-se o microcrustáceo *Artemia salina*. Para isso as larvas foram incubadas por 24h em água marinha sintética, solução de 1,2% de NaCl.

As análises foram realizadas transferindo-se 10 larvas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água do mar sintética e 5 mL da solução do biossurfactante em diferentes concentrações baseadas na CMC, depois de 24h observados quanto à mortalidade. O controle foi realizado utilizando água marinha sintética (SILVA et al., 2010; SILVA, 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o processo de produção de biossurfactante por meio de bactérias isoladas de uma usina sucroalcooleira empregando substratos alternativos.

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS

As características físico-químicas dos resíduos usados como substratos no processo fermentativo estão apresentadas na Tabela 5. O potencial hidrogeniônico (pH) dos substratos utilizados apresentaram pH ácido, ficando de 3,60-5,65, com exceção da polpa de coco que apresentou pH 7,05. Os maiores valores de °Brix foram identificados para o melão e óleo de soja residual. Em relação aos açúcares redutores e totais, os maiores valores foram obtidos com melão de cana, sendo 329,1 g/L e 737,35 g/L, respectivamente. Já o óleo de soja residual apresentou uma concentração de açúcares redutores de apenas 0,32 g/L.

Tabela 5 - Características físico-químicas dos substratos utilizados

	Melão de cana	Manipueira	Vinhaça	Polpa de coco	Óleo de soja residual
pH	5,3 ± 0,1	5,65 ± 0,1	4,32 ± 0,0	7,05 ± 0,1	5,80 ± 0,0
°Brix	69,9 ± 0,1	7,3 ± 0,0	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2	72,3 ± 0,3
AR (g.L ⁻¹)	329,1 ± 0,5	32,67 ± 0,1	3,33 ± 0,4	6,60 ± 0,1	0,32 ± 0,2
ART (g.L ⁻¹)	737,35 ± 0,7	42,47 ± 0,6	5,28 ± 0,2	8,33 ± 0,3	
Lipídios Totais (g/100 mL)				0,61 ± 0,0	

O pH encontrado para a vinhaça foi 4,32, valor muito próximo ao encontrado por Morais (2012) que encontrou um pH de 4,47. Para a manipueira o valor encontrada no presente trabalho foi de 5,65 enquanto que o encontrado por Morais (2012) foi de 4,24. Essa diferença se deve aos fatores que podem influenciar a composição e características da manipueira, como as condições climáticas e características do solo (BARANA, 2000; MORAIS, 2012).

Leal et al. (2013) encontraram valores de lipídios totais da polpa de coco verde in natura de frutos comercializados nas praias de São Luís-MA, variando entre 0,96 e 1,33 g/100 mL, enquanto que nesse trabalho foi de 0,61 g/100 mL. Essa diferença se deve ao fato do

autor ter utilizado a polpa pura, enquanto que nesse trabalho a polpa foi processada com água em uma proporção de 1:1.

4.2 SELEÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE

Para a seleção inicial das bactérias foi realizado um cultivo com as 20 linhagens com o meio utilizando glicose (10 g/L) como substrato e suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual. Ao final de 96h de cultivo foram analisados os resultados de tensão superficial e índice de emulsificação com óleo de motor. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6. Sendo, IE o índice de emulsificação, TS a tensão superficial em 96 horas de cultivo e RTS a redução percentual da tensão superficial, calculada considerando a tensão inicial como a tensão superficial do meio antes da inoculação.

Tabela 6 - Índice de emulsificação, tensão superficial final e percentual de redução da tensão superficial das bactérias isoladas do solo e da torta de filtro utilizando como substrato glicose (10 g/L) suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual

Microrganismo	IE (%)	TS (mN/m)	RTS (%)
JTF1	92,5 ± 1,25	53,92 ± 3,91	17,41 ± 6,00
JTF2	89,74 ± 1,92	59,81 ± 1,93	8,39 ± 2,96
JTF3	88,75 ± 0,62	54,09 ± 0,04	17,15 ± 0,05
JTF4	80,48 ± 1,0	64,69 ± 0,05	0,927 ± 0,08
JTF6	78,41 ± 1,70	60,73 ± 0,99	6,978 ± 1,51
JTF7	93,54 ± 0,80	44,87 ± 4,85	31,28 ± 7,43
JTF14	93,33 ± 0,55	54,06 ± 2,02	17,21 ± 3,09
JTF15	85,71 ± 0,00	63,72 ± 0,92	2,39 ± 1,42
JTF17	80,00 ± 1,25	63,15 ± 0,34	3,27 ± 0,53
JTF19	80,00 ± 2,5	67,42 ± 1,13	-3,26 ± 1,73
JTF20	94,87 ± 1,92	58,45 ± 2,15	10,48 ± 3,29
JTF21	93,55 ± 0,11	59,43 ± 0,25	8,97 ± 0,39
JS2	90,00 ± 0,62	55,81 ± 1,51	14,53 ± 2,32
JS10	82,50 ± 2,5	59,89 ± 2,11	8,27 ± 3,23
JS11	86,58 ± 0,79	61,68 ± 0,01	5,54 ± 0,02
JS15	83,75 ± 1,63	58,78 ± 4,25	9,97 ± 6,51
JS18	95,00 ± 1,25	53,44 ± 0,91	18,14 ± 1,40
JS19	94,87 ± 0,07	50,95 ± 1,2	21,96 ± 2,09
JS20	96,15 ± 0,65	40,56 ± 9,25	37,88 ± 14,17
JS21	89,28 ± 0,48	61,98 ± 2,91	5,07 ± 4,46

Analisando os resultados de índice de emulsificação verifica-se que todas as linhagens apresentaram valores superiores a 80%. O melhor resultado foi obtido com a bactéria JS20, sendo o índice de emulsificação de $96,15 \pm 0,15\%$.

Com os resultados de redução da tensão superficial podemos perceber que a linhagem JTF19 apresentou um aumento de $3,26 \pm 1,73\%$ na redução superficial, não sendo essa linhagem, portanto, produtora de biossurfactante nas condições estudadas. As bactérias JTF2, JTF4, JTF6, JTF15, JTF17, JTF21, JS20, JS10, JS11, JS15 e JS21 apresentaram reduções de tensão superficial inferiores a 10% e, portanto, foram desprezadas.

As 5 bactérias que apresentaram os melhores resultados de redução de tensão superficial foram as JTF7, JTF14, JS18, JS19 e JS20, sendo eles, respectivamente $31,28 \pm 7,43\%$, $17,21 \pm 3,09\%$, $18,14 \pm 1,40\%$, $21,96 \pm 2,09\%$ e $37,88 \pm 14,17\%$. O melhor resultado foi obtido com a linhagem isolada do solo, JS20, em que apresentou uma tensão superficial final média de $40,56 \pm 9,25$ mN/m.

Com essas bactérias foi realizado um novo cultivo utilizando o meio Santa Anna, com melão como substrato e suplementado com óleo de soja residual e também outro cultivo utilizando melão e óleo de soja residual, mas sem a adição de sais. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7. Para o cálculo do percentual de redução da tensão superficial foram consideradas como tensão inicial a tensão do meio antes da inoculação. A tensão superficial do meio sem adição de sais antes da inoculação foi de 60,74 mN/m e do meio com sais foi de 63,95 mN/m.

Tabela 7 - Índice de emulsificação em óleo de soja, Tensão superficial e percentual de redução da tensão superficial das bactérias JTF7, JTF14, JS18, JS19 e JS20 em 96h de cultivo, utilizando melão como substrato em meio sem adição de sais.

Microrganismo	Sem adição de sais			Com adição de sais		
	IE	TS (mN/m)	RTS(%)	IE	TS (mN/m)	RTS(%)
JTF7	35,89±1,28	61,24± 0,10	-0,82±0,16	38,09±1,55	56,04±1,79	12,38±2,81
JTF14	41,98±1,76	63,22±0,11	-4,08±0,18	40,00±0,77	54,35±1,39	15,02±2,17
JS18	35,00±1,25	53,21±1,43	12,39±2,36	38,37±0,04	49,27±9,11	22,96±14,25
JS19	33,75±0,62	56,12±2,87	11,74±8,88	37,77±0,34	50,96±2,58	20,31±4,03
JS20	40,50±2,75	58,30±0,12	4,02±0,20	44,56±1,00	49,57±5,39	22,49±8,43

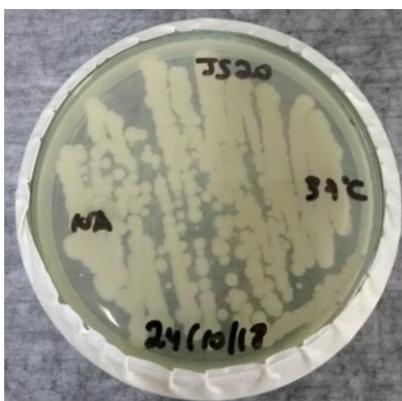
Analisando a Tabela 7 observa-se que, em termos de tensão superficial, a adição de sais no meio favoreceu em todos os casos a produção de biossurfactantes, uma vez que houve redução da tensão superficial. No meio sem a adição de sais houve aumento da tensão com as

bactérias JTF7 e JTF14, o que mostra a importância das fontes de nitrogênio, fósforo e magnésio na síntese de biossurfactantes.

Foram obtidos resultados bem próximos utilizando os microrganismos JS18 e JS20, com valores médios de redução de tensão superficial de $22,96 \pm 14,25$ % e $22,49 \pm 8,43$ %, respectivamente. Em relação ao índice de emulsificação em óleo de soja, foram obtidos valores superiores quando utilizado o meio com sais, com exceção da JTF14 que apresentou um índice de emulsificação semelhante quando não houve acréscimo de sais na composição do meio de cultivo. O melhor resultado foi obtido com a JS20 em meio com sais sendo o valor obtido de IE 44,56%.

Devido a esses resultados obtidos aliados a seleção inicial com o meio composto com glicose foi escolhida a linhagem JS20, isolada do solo, para a condução dos demais experimentos. A bactéria selecionada foi caracterizada morfológicamente como de colônia pequena, circular, côncava, bordas regulares, branca brilhosa, leitosa e sem pico central (SOUZA JÚNIOR, 2018). Na Figura 9 está apresentada a bactéria selecionada, JS20.

Figura 9 - Bactéria isolada do solo, JS20



4.3 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO

Foi realizada uma avaliação do crescimento da linhagem JS20 utilizando diferentes fontes de carbono, a fim de determinar o substrato mais adequado para a utilização no processo fermentativo objetivando a produção biotecnológica de surfactantes. Os cultivos foram realizados nas mesmas condições de temperatura 30°C, agitação 200 rpm e concentração de inóculo 10% v/v.

O crescimento da linhagem foi avaliado durante 96 h, sendo retiradas amostras a cada 24h, com exceção das 12 primeiras horas de cultivo em que foram coletadas amostras a

cada 3 horas. Foram realizados 7 experimentos com a composição conforme mostrada na Tabela 8. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

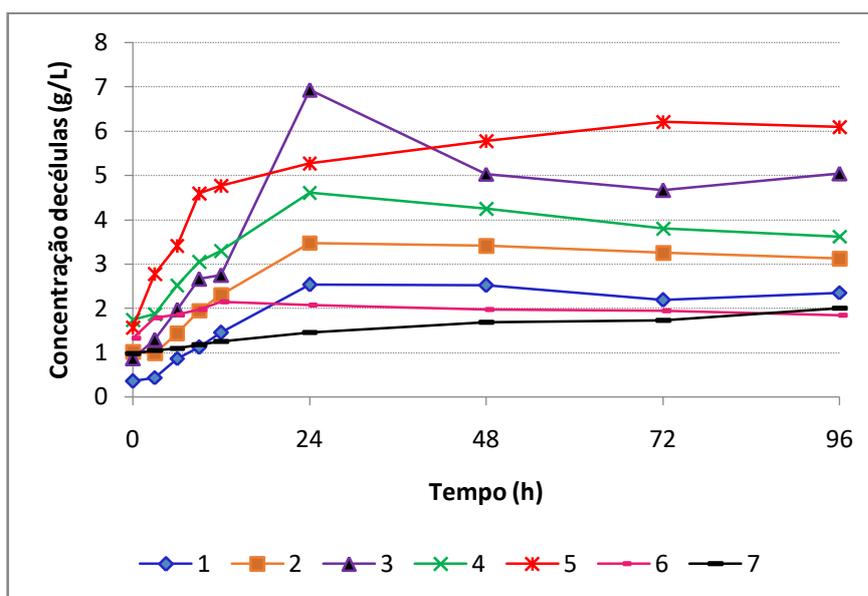
Tabela 8 - Composição dos meios de cultivo utilizados para a avaliação das fontes de carbono

Meio	Composição
1	Glicose 10 g/L + 2 g/L de OSR
2	Glicose 10 g/L + 20 g/L de polpa de coco
3	Melaço 10 g/L de AR + 2 g/L de OSR
4	Melaço 10 g/L de AR + 20 g/L de polpa de coco
5	Vinhaça em proporção de 1:1 com água destilada e ajustado para 10 g/L de AR com o melaço + 5 g/L de OSR
6	Polpa de coco (40 g/L)
7	Manipueira 10 g/L de AR + 5 g/L de OSR

O perfil cinético do crescimento da bactéria utilizando as 7 diferentes formulações está apresentado na Figura 10. É possível observar que a linhagem JS20 apresentou crescimento utilizando todos os substratos, pois houve aumento da concentração de células, o que mostra ser capaz de consumir diferentes substratos.

O melhor crescimento foi observado com o meio 3 que utiliza melaço e óleo de soja residual como indutor, alcançando uma concentração máxima de células de $6,94 \pm 0,03$ g/L em apenas 24h de cultivo, seguido do meio 5, que combina melaço com vinhaça e óleo de soja residual, com uma concentração máxima de células de $6,21 \pm 0,37$ g/L em 72 h de cultivo. Os dois meios tem em comum que usam melaço com adição de sais e no meio 5 tem vinhaça.

O menor crescimento foi observado utilizando o meio 7 em que é utilizado manipueira como substrato, sendo a concentração máxima de biomassa de $1,99 \pm 0,07$ g/L em 96 h de cultivo. Isso se deve a baixa quantidade de substrato disponível para o microrganismo. Após a esterilização do meio em autoclave formou-se uma grande quantidade de precipitado que foi removida por filtração, após as análises de concentração de substrato pelo método do DNS constatou-se que a maior parte dos açúcares estava presente naquele precipitado, restando assim menos de 3 g/L de AR disponível para o crescimento.

Figura 10 -Perfil cinético de crescimento em diferentes fontes de carbono

A Figura 11 apresenta curva de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com os meios 1 e 2. Com o meio 1, em que foi utilizado glicose 10 g/L suplementado com 2 g/L de OSR, foi alcançado uma concentração máxima de biomassa de $2,53 \pm 0,11$ g/L em 24 h de cultivo. Em 96h de cultivo, cerca de 80% do substrato havia sido consumido. Com o meio 2, em que foi utilizado glicose (10 g/L) + 20 g/L de polpa de coco, a concentração máxima de biomassa foi atingida em 24h de cultivo, sendo ela de $3,48 \pm 0,04$ g/L. Ao final do cultivo 91% do substrato havia sido consumido, o que mostra que a quantidade fornecida foi adequada para o crescimento. A substituição do óleo de soja residual pela polpa de coco favoreceu o crescimento do microrganismo. Esse fato fica evidenciado pelo aumento na produção de biomassa que foi superior em 0,9491 g/L quando utilizado a polpa de coco ao invés do óleo residual.

A Figura 12 mostra a curva de crescimento e consumo de substrato com os meios 3, 4 e 5. Com o meio 3, em que foi utilizado melão (10 g/L de AR) suplementado com 2 g/L de OSR foi atingida uma concentração máxima de células de $6,94 \pm 0,03$ g/L em 24h de cultivo. Em relação à concentração de substrato, como o meio foi preparado ajustando a concentração do melão para 10 g/L de AR, a concentração inicial de substrato total disponível para o microrganismo foi muito superior devido ao fato do melão ser rico em sacarose, estando disponível para o microrganismo nos experimentos 3, 4 e 5 uma concentração de ART de aproximadamente 22 g/L. Rocha (2017) estudou a influência da temperatura, agitação e razão de aeração na síntese de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão como substrato. A concentração máxima de células obtidas pelo autor de $1,48 \pm 0,03$ em 24h

de cultivo nas condições de temperatura de 36°C, agitação de 200 rpm e razão de aeração de 0,6. Marim et al. (2015) obteve um aumento máximo de biomassa de 2,26 g/L em biossurfactante produzido também por *Bacillus subtilis* utilizando melão.

Figura 11 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato da bactéria JS20 nos meios de glicose com óleo de soja residual (1) e glicose com polpa de coco (2)

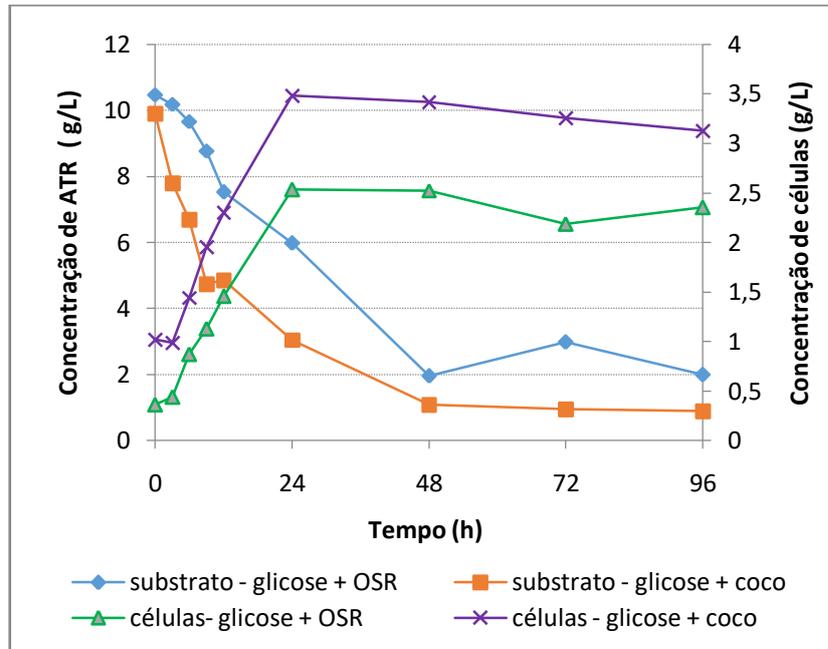
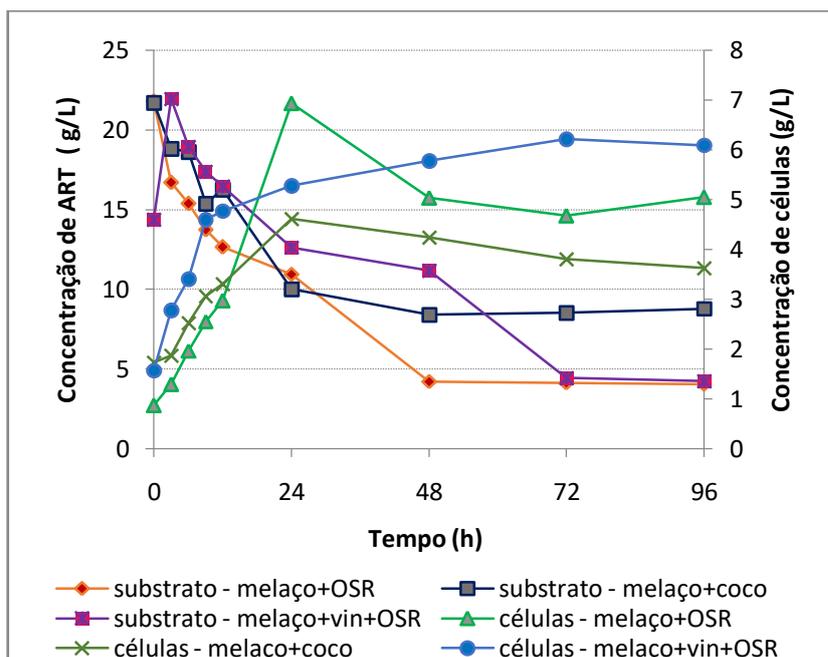


Figura 12 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato a partir da bactéria JS20 nos meios de melão com óleo de soja residual (3), melão com polpa de coco (4) e melão com vinhaça e óleo de soja residual (5)

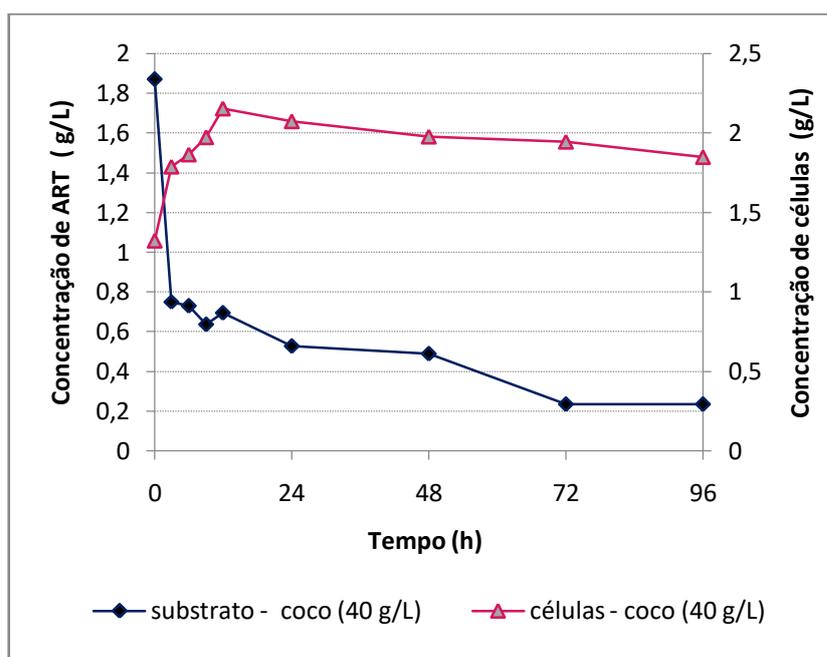


Utilizando o meio 3, ao final do cultivo ainda tinha disponível 4 g/L de substrato, indicando um excesso de melação necessário para o crescimento do microrganismo. Com o meio 4 a concentração máxima de biomassa ocorreu em 24 h de cultivo com uma concentração de $4,62 \pm 0,10$ g/L. Ao final do cultivo ainda restaram aproximadamente 9 g/L de substrato, mais que o dobro do que havia ao final do experimento utilizando o meio 3. Já com o meio 5 a concentração máxima de biomassa foi de $6,22 \pm 0,15$ g/L em 72h de cultivo. Ao final do cultivo a bactéria havia consumido 80% do substrato fornecido.

Comparando os experimentos 3 e 4 pode-se constatar que, diferentemente do ocorrido quando utilizada a glicose como substrato, a substituição do óleo de soja residual por polpa de coco, em meio composto por melação, desfavoreceu o crescimento do microrganismo, pois houve uma redução na produção de células. E comparando os meios 3 e 5 percebe-se que a adição de vinhaça na composição do meio e o aumento da concentração de óleo residual favoreceram o crescimento da bactéria, exceto para o tempo de 24 horas.

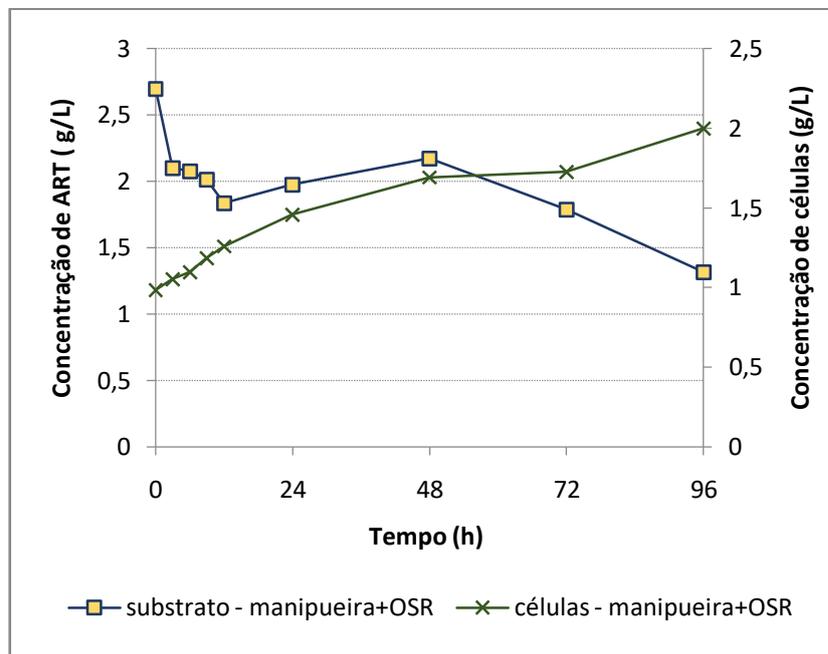
Na Figura 13 está representada a curva de crescimento celular e consumo de ART utilizando o meio com polpa de coco (40 g/L) (6). Quando foi utilizado como substrato a polpa de coco 40 g/L foi obtida uma concentração máxima de células de $2,15 \pm 0,21$ g/L em 12 h de cultivo. O crescimento foi muito baixo quando comparado com os demais meios. Isso se deve a baixa concentração de ART disponível para o crescimento do microrganismo.

Figura 13 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato a partir da bactéria JS20 no meio com polpa de coco (6)



Na Figura 14 está representada a curva de crescimento celular e consumo de ART utilizando o meio composto por manipueira e óleo de soja residual (7). Com o meio 7, mesmo com uma concentração maior de ART o meio com manipueira teve um desempenho inferior quando comparado a polpa de coco no crescimento do micorganismo. A concentração máxima de células obtida foi de 1,99 g/L em 96h de cultivo. Em relação à concentração de substrato, após o processo de esterilização em autoclave houve a formação de grande quantidade de precipitado, que foi removido por filtração. Após as análises de açúcares redutores verificou-se que o precipitado consistia em sua maioria em açúcares, ficando apenas disponível para a fermentação aproximadamente 3 g/L de AR. Os meios formulados exclusivamente com polpa de coco e com manipueira não apresentaram resultados satisfatórios quando comparados como os demais ensaios. Bezerra (2012) estudou a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando manipueira como fonte de carbono. A concentração máxima de células encontrada pelo autor foi de 3,0 g/L utilizando as condições de 100 rpm, temperatura de 40°C, RA de 0,4 e concentração de manipueira de 4%.

Figura 14 - Curva de crescimento celular e consumo de substrato a partir da bactéria JS20 no meio com manipueira e óleo de soja residual (7)



Os parâmetros cinéticos dos cultivos a partir de diferentes fontes de carbono estão apresentados na Tabela 9. A produtividade em células e o fator de conversão de substrato em células foram calculados para um tempo de 24h de cultivo, tempo em que os cultivos atingiram a fase estacionária de crescimento. No meio 1 a produtividade em biomassa foi de

0,09 g/L.h, uma velocidade máxima específica de crescimento de $0,12 \text{ h}^{-1}$, tempo de geração de 5,63 h e rendimento de substrato em biomassa de $0,48 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. Já no meio 2 a produtividade em biomassa foi de 0,10 g/L.h, com velocidade máxima específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$, tempo de geração de 7,00 h e rendimento de substrato em biomassa de $0,36 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. A produtividade em biomassa utilizando a polpa de coco foi superior a utilizando óleo residual. Em termos de conversão de substrato em biomassa e velocidade máxima específica de rendimento os melhores resultados foram obtidos quando utilizado o óleo de soja residual na composição do meio.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos das fontes de carbono

Meio	P_x (g/L.h)	$Y_{x/s}$ (g _{célula} /g _{substrato})	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Tg (h)
1	0,09	0,48	0,12	5,63
2	0,10	0,36	0,09	7,00
3	0,25	0,56	0,12	5,54
4	0,11	0,24	0,07	10,04
5	0,15	0,39	0,11	6,08
6	0,02	0,34	0,02	34,65
7	0,02	0,85	0,02	43,32

Comparando os meios 3, 4 e 5 temos que a maior produtividade em biomassa e o maior rendimento de substrato em biomassa foram obtidos no meio 3, composto por melaço de OSR, sendo, respectivamente, 0,25 g/L.h e $0,56 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. O que indica uma boa adaptação do microrganismo ao meio de cultivo. A maior velocidade específica de crescimento foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$ e o menor tempo de geração, 5,54 h, foram alcançados também no experimento 3.

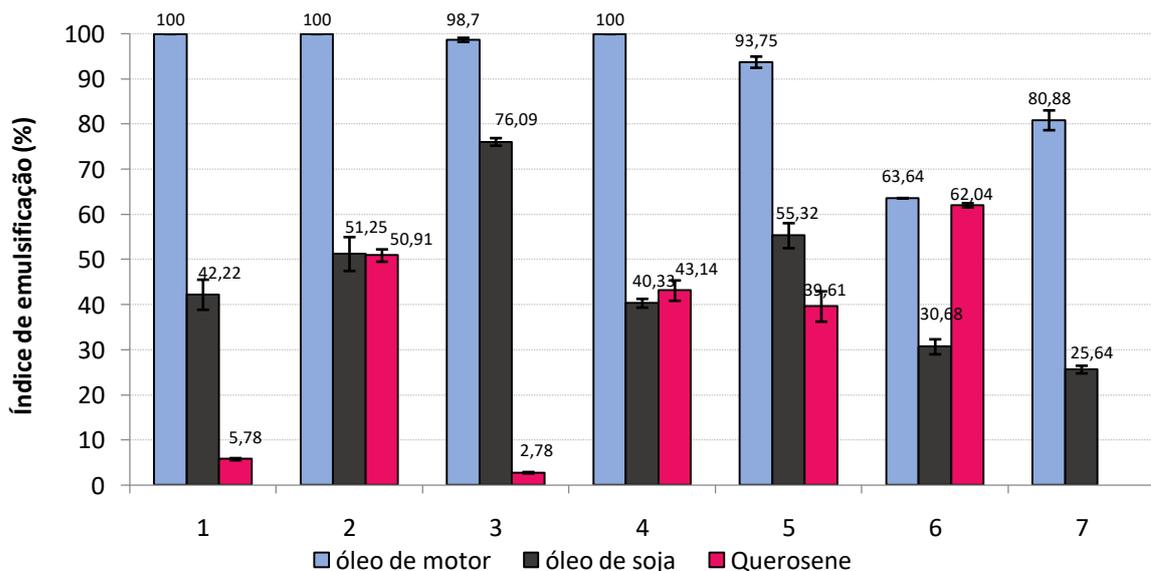
Comparando os meios 6 e 7 temos que as produtividades obtidas foram bem próximas, sendo de 0,018 g/L h para o meio 6 e de 0,019 g/L h para o meio 7. Os maiores tempos de geração foram obtidos para os meios 6 e 7, sendo, respectivamente 34,65 h e 43,32h. O maior rendimento de substrato em células foi alcançada no experimento 7, em meio formulado com manipueira, sendo de $0,85 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. Bezerra (2012) encontrou uma produtividade próxima ao do presente trabalho, de 0,019 g/L h quando utilizada as condições de 100 rpm de agitação, temperatura de 40°C, RA de 0,8 e concentração de 50% de manipueira no meio. Mas a produtividade máxima encontrada pelo autor foi de 0,135 g/L com

agitação de rpm, temperatura de 30°C, RA de 0,4 e manipueira sem diluição. Em outros ensaios comparativos realizados pelo autor foi constatado que a maior produtividade foi justificada pela razão de aeração, o que mostra que a preferência do microrganismo estudado, *Pseudomonas aeruginosa*, para ambientes de aerobiose em mesmas condições de cultivo.

Fazendo um comparativo entre as fontes de carbono temos que a maior produtividade foi de 0,25 g/L h no meio 3, em meio formulado combinando melaço com óleo de soja residual. Já o maior rendimento de substrato em biomassa foi alcançado no meio 7, em meio formulado com a manipueira. Embora tenha sido fornecida uma pequena quantidade de substrato ao microrganismo ele conseguiu se adaptar bem ao meio de cultivo. As melhores velocidades específicas de crescimento e os menores tempos de geração foram obtidos no meio 1, em meio formulado com glicose e óleo de soja residual, sendo, respectivamente 0,123 h⁻¹ e 5,63 h. E no meio 3 em meio formulado com melaço e óleo de soja residual, sendo a velocidade máxima específica de crescimento 0,1250 h⁻¹ e o tempo de geração de 5,54 h.

Para a determinação do índice de emulsificação (IE) foram usados diferentes compostos, tais como óleo de motor, óleo de soja e querosene. Os testes foram realizados em duplicata e o resultado foi expresso como sendo a média dos valores obtidos. Os resultados dos índices de emulsificação do caldo fermentado livre de células em 96h de cultivo utilizando a bactéria JS20 a partir de diferentes fontes de carbono estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Índice de emulsificação das fontes de carbono em 96h de cultivo



Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa como gotículas microscópicas em outra fase líquida contínua. Os biotensoativos podem estabilizar (emulsionantes) ou desestabilizar (desemulsionantes) a emulsão (DESAI E BANAT, 1997).

Utilizando óleo de motor virgem foram obtidos índices de emulsificação de 100% com os meios 1, 2, e 4. Os resultados mais baixos foram obtidos nos meios 6 e 7, sendo respectivamente 63,64% e 80,88%. Com o óleo de soja o melhor índice de emulsificação foi obtido com o meio 3, em meio composto por melão e óleo de soja residual, sendo o resultado obtido de 76,09%. Prieto et al. (2008) relataram que o óleo de soja é um bom substrato para a emulsificação.

Já com querosene não foram obtidos resultados satisfatórios nos meios 1 e 3 em que os índices de emulsificação foram inferiores a 6% e no meio 7, em que foi utilizado manieira como substrato não houve emulsificação. Bezerra (2012) encontrou resultados satisfatórios de índice de emulsificação em querosene, variando de 50% a 68,97% na melhor condição do planejamento experimental realizado. Os melhores resultados obtidos no presente trabalho foram nos meios com polpa de coco no meio, sendo de 50,91% no meio 2, 43,14 % no meio 4 e de 62,04% no meio 6. O meio 6 não teve bom índice de emulsificação para óleo de motor, mas foi o melhor resultado para o querosene. Cada composto hidrofóbico usado possui características distintas como composição, tamanho da cadeia e densidade. Bezerra (2006) obteve no melhor resultado do planejamento experimental um índice de emulsificação de 64,29% em querosene utilizando um microrganismo isolado de poços de petróleo nas condições de concentração 0,2% de NaNO_3 , 2% de melão e razão de aeração de 0,5.

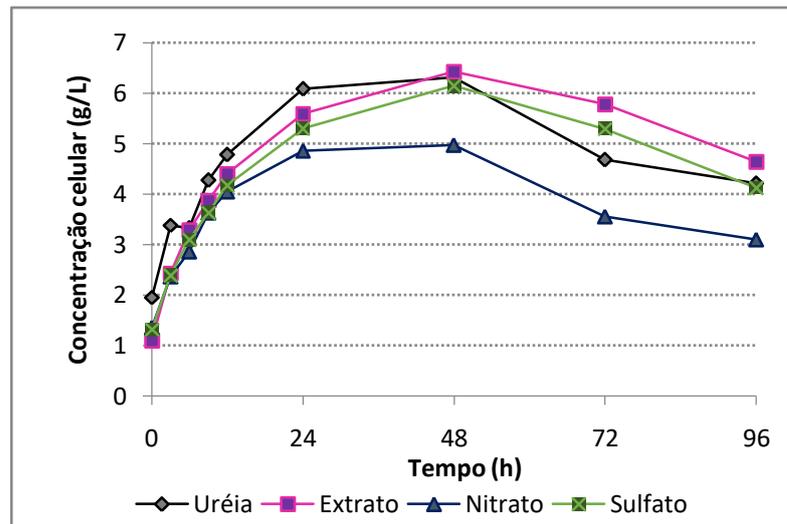
Avaliando os resultados conjuntos de concentração de células e IE dos meios avaliados, os meios com melão apresentam resultados semelhantes aos com glicose, com a vantagem do melão ser um subproduto da agroindústria.

4.4 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO

Foram testadas 4 fontes de nitrogênio nas mesmas condições de cultivo em meio proposto por Santa Anna (2001), utilizando como substrato melão em uma concentração de 10 g/L de AR e suplementado com 5 g/L de óleo de soja residual. As fontes de nitrogênio foram: ureia, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de amônio, todos com uma concentração de 1 g/L. As curvas de crescimento celular estão mostradas na Figura 16. Os resultados obtidos foram muito próximos com exceção do nitrato de sódio. Embora o inóculo tenha sido preparado de forma padronizada, a concentração inicial de células em meio com extrato de levedura foi maior que das demais fontes de nitrogênio, o que mostra que o

microrganismo assimilou melhor essa fonte de nitrogênio desde o preparo do inóculo. A maior concentração de células foi obtida utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio, com uma concentração máxima de biomassa de 6,43 g/L, seguido da ureia com uma concentração de 6,31 g/L.

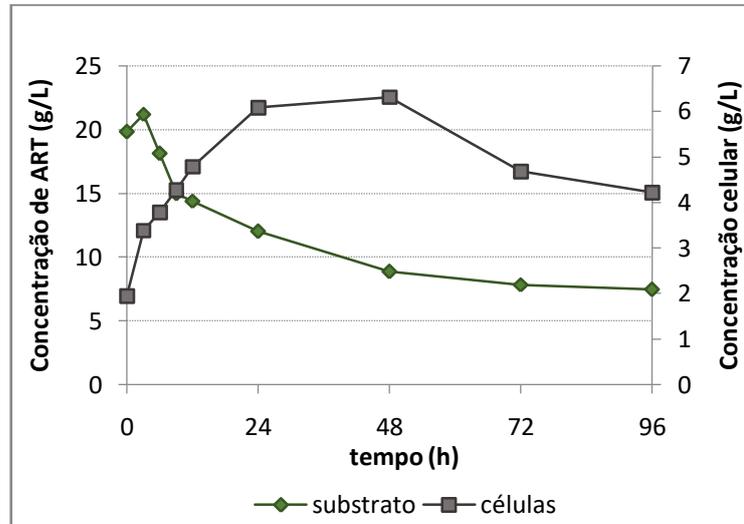
Figura 16 - Crescimento celular em diferentes fontes de nitrogênio



A Figura 17 apresenta a curva de crescimento de células e de consumo de ART utilizando ureia como fonte de nitrogênio ao longo das 96h de cultivo. A concentração máxima de biomassa foi de $6,31 \pm 0,22$ g/L em 48h de cultivo. Em relação à concentração de ART é possível perceber que havia mais do que necessário ao crescimento da bactéria, restando ao final do cultivo 7,46 g/L. Isto pode ter ocorrido pela carência de algum outro nutriente do meio ou pela formação de algum metabólico tóxico.

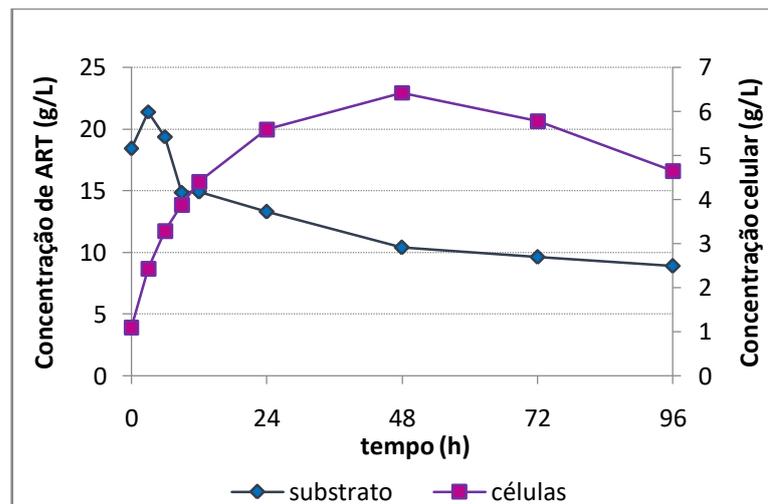
O pH do meio que inicialmente era de 6,88 caiu para 5,4 ao final do processo fermentativo. Não foi realizado nenhum ajuste de pH, os componentes do meio fazem uma espécie de tamponamento, fazendo com que o meio de cultura fique com pH de aproximadamente 7. A acidificação do meio de cultivo durante a fermentação já foi relatada por outros pesquisadores. O melaço de cana propicia a formação de metabólitos como ácidos orgânicos que reduzem o pH do meio (MARIM, 2014). Esse comportamento foi observado com todas as fontes de nitrogênio avaliadas.

Figura 17- Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando uréia (1 g/L) como fonte de nitrogênio



A cinética de crescimento celular e consumo de ART utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio está mostrada na Figura 18. Em 48h de cultivo foi obtida a concentração máxima de biomassa de $6,43 \pm 0,25$ g/L. É possível perceber um excesso de ART na composição do meio, havendo aproximadamente 40% de substrato ao final do processo fermentativo. O pH que inicialmente era 6,88 ao final das 96h ficou 4,98.

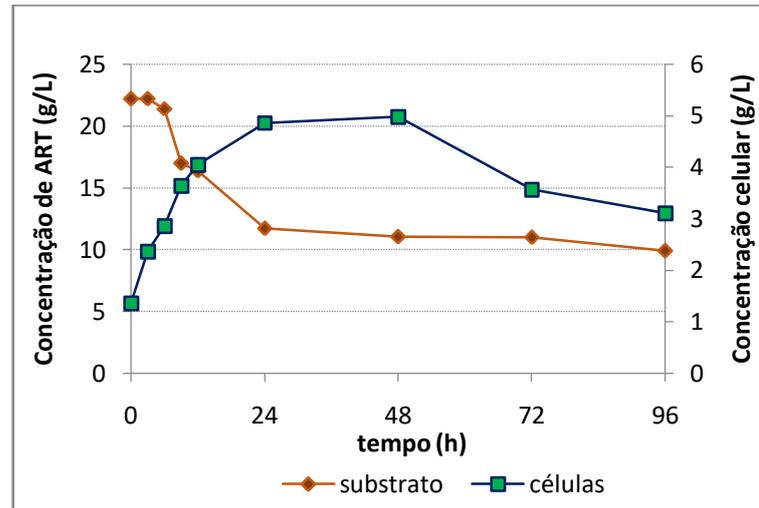
Figura 18 - Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando extrato de levedura (1 g/L) como fonte de nitrogênio



Na Figura 19 está apresentada a curva de crescimento e consumo de ART utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Dentre as fontes de nitrogênio testada essa foi a que apresentou o menor crescimento, sendo a concentração máxima de células de $4,98 \pm 0,02$ g/L.

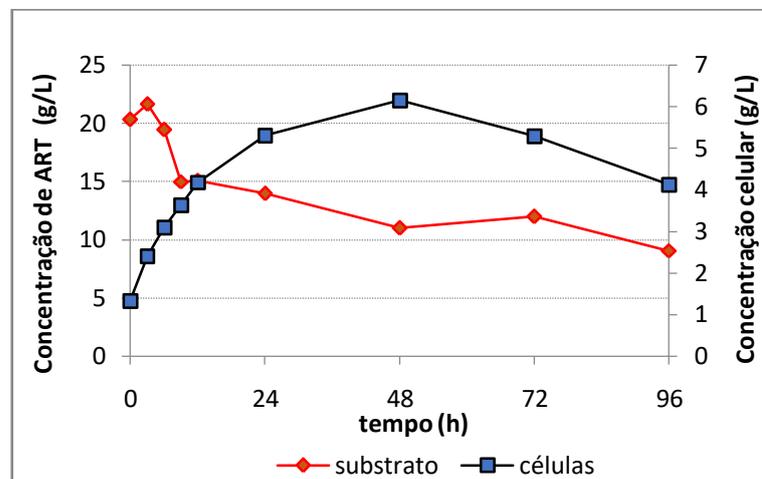
A concentração de substrato ao final do cultivo foi de 9,87 g/L. Em relação ao pH foi observado o mesmo comportamento que as demais fontes de nitrogênio, com uma redução do pH do meio de cultivo de 6,98 para 5,29.

Figura 19 - Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando nitrato de sódio (1 g/L) como fonte de nitrogênio



Na Figura 20 está mostrada a curva de crescimento celular e concentração de ART utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio ao longo de 96h de cultivo. A máxima concentração de células obtida foi de $6,15 \pm 0,12$ g/L em 48h com posterior declínio da concentração. A concentração final de ART foi 9,06 g/L. O pH que inicialmente estava em 6,83 caiu para 5,11 às 96h de cultivo.

Figura 20 - Curva de crescimento e concentração de substrato utilizando sulfato de amônio (1 g/L) como fonte de nitrogênio



Os parâmetros cinéticos dos cultivos a partir de diferentes fontes de nitrogênio estão apresentados na Tabela 10. A produtividade em biomassa e o fator de conversão de substrato em biomassa foram calculados para um tempo de 24 h de cultivo. A maior produtividade em biomassa foi obtida utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura, sendo esse valor de 0,172 g/L h.

Em termos de conversão de substrato e biomassa as duas fontes de nitrogênio que apresentaram os melhores resultados foram extrato de levedura e sulfato de amônio, sendo 0,839 g_{célula}/g_{substrato} utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio e 0,640 g_{célula}/g_{substrato} com sulfato de amônio, o que mostra que o microrganismo se adaptou bem às condições de cultivo. Enquanto a melhor velocidade específica máxima de crescimento, 0,065 h⁻¹ e o menor tempo de geração, 10 h foram obtidos quando utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Utilizando nitrato de sódio e sulfato de amônio as velocidades específicas máximas de crescimento e os tempos de geração foram muito próximos.

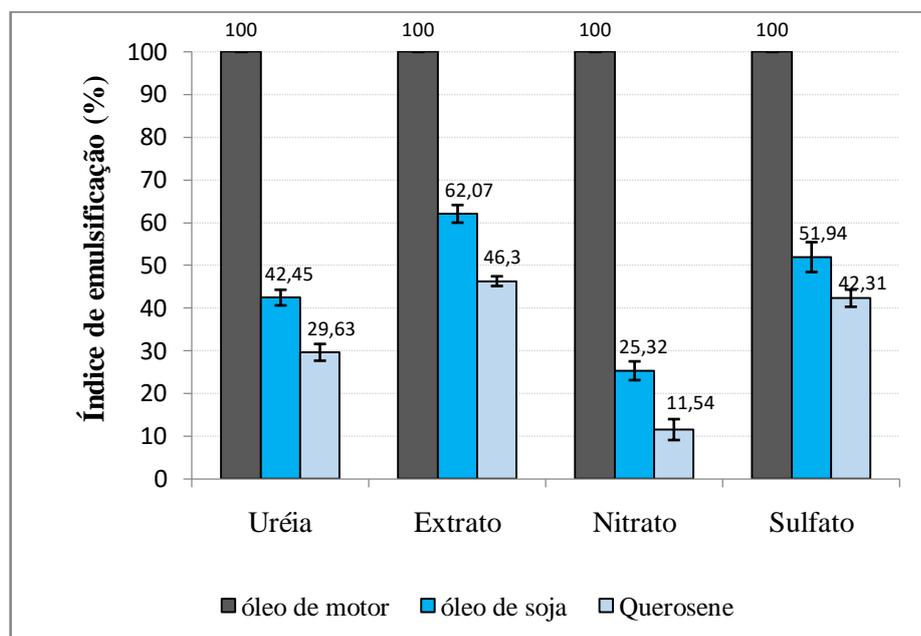
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos dos cultivos utilizando diferentes fontes de nitrogênio

Experimento	P_x (g/L.h)	Y_{x/s} (g_{célula}/g_{substrato})	μ_x (h⁻¹)	T_g (h)
Uréia	0,172	0,528	0,046	15,600
Extrato	0,179	0,839	0,065	10,664
Nitrato	0,146	0,324	0,061	11,363
Sulfato	0,170	0,640	0,060	11,552

Na Figura 21 estão apresentados os resultados de índice de emulsificação utilizando as diferentes fontes de nitrogênio em 96h de cultivo. Foram utilizados como compostos hidrofóbicos o óleo de motor, óleo de soja e querosene. Os testes foram realizados em duplicata e o seu resultado foi expresso como sendo a média dos valores obtidos.

Utilizando óleo de motor como composto hidrofóbico foram obtidos índices de emulsificação de 100% para todas as fontes de nitrogênio. Já com o óleo de soja, os melhores resultados foram obtidos utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio, sendo o índice de emulsificação obtido de 62,07% e com o sulfato de amônio, sendo esse valor de 51,94%. Utilizando querosene os melhores resultados foram também obtidos utilizando extrato de levedura e sulfato de amônio, sendo, respectivamente, 46,3% e 42,31%.

Figura 21 - Índice de Emulsificação do caldo fermentado livre de células utilizando diferentes fontes de nitrogênio às 96h cultivo.



Os resultados de índice de emulsificação serviram como parâmetro para a definição da fonte de nitrogênio, pois esse parâmetro é uma forma de determinar indiretamente a presença de substâncias tensoativas no meio de cultivo. Os melhores resultados de índice de emulsificação foram obtidos utilizando extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio na composição do meio. Como os índices de emulsificação obtidos foram muito aproximados optou-se pelo sulfato de amônio devido ao fato deste apresentar um custo bem inferior quando comparado ao extrato de levedura.

Silva (2016) avaliou as mesmas fontes de nitrogênio no cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, usando glicerol como fonte de nitrogênio. Na análise do crescimento celular os melhores resultados foram usando sulfato de amônio e ureia, mas em termos de tensão superficial os melhores valores foram com extrato de levedura e sulfato de amônio sendo 32,9 e 33,2 mN/m respectivamente.

4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO, RAZÃO DE AERAÇÃO E INDUTOR

A partir do planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central foi analisada a influência dos fatores concentração de sulfato de amônio (CN); razão de aeração (RA), definida como sendo a razão entre o volume de meio e volume do frasco; e do indutor

(I) nas respostas concentração de biomassa, índice de emulsificação em óleo de soja e índice de emulsificação em querosene. Os cultivos foram realizados por um período de 72 horas.

Na Tabela 11 estão apresentadas as condições de cultivo dos ensaios realizados e os valores das respostas concentração celular (X), índice de emulsificação em óleo de soja (IE-OS) e índice de emulsificação em querosene (IE-Q) e redução de tensão superficial (RTS).

Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central

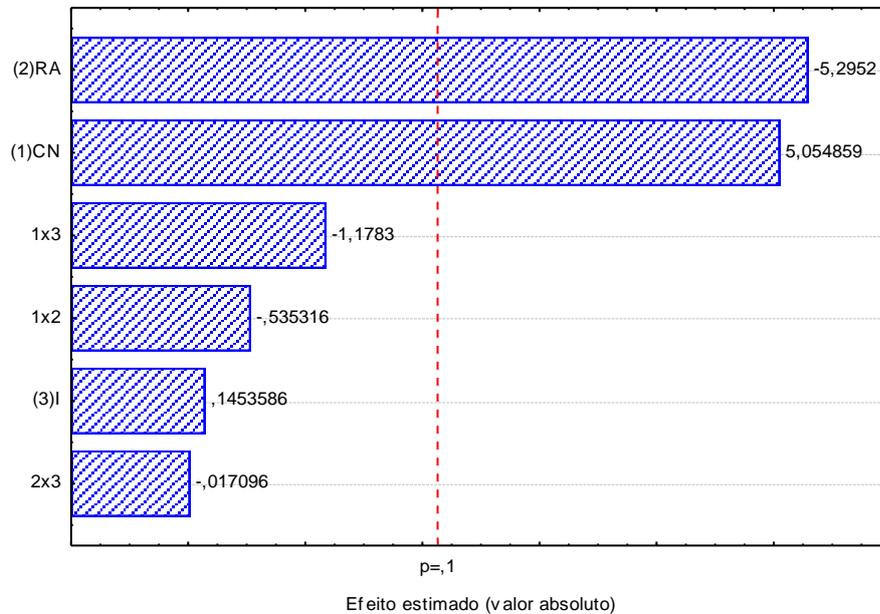
Experimento	Variáveis			Respostas			
	CN	RA	I	X(g/L)	IE-OS (%)	IE-Q (%)	RTS (%)
P1	-1 (1)	-1 (0,33)	-1 (Coco 20g/L)	3,55	42,1	43,26	21,49
P2	+1 (3)	-1(0,33)	-1 (Coco 20g/L)	6,03	50	50,94	5,67
P3	-1 (1)	+1(0,67)	-1 (Coco 20g/L)	2,58	31,58	28,84	5,22
P4	+1 (3)	+1(0,67)	-1 (Coco 20g/L)	3,84	56,41	17,14	10,30
P5	-1 (1)	-1 (0,33)	+1 (OSR 5 g/L)	4,40	45,94	18,18	3,83
P6	+1 (3)	-1(0,33)	+1 (OSR 5 g/L)	5,28	48,71	41,9	0,17
P7	-1 (1)	+1(0,67)	+1 (OSR 5 g/L)	2,52	30	41,51	29,00
P8	+1 (3)	+1(0,67)	+1 (OSR 5 g/L)	3,98	46,15	35,85	2,67
P9	0 (2)	0 (0,5)	0 (Coco 10 g/L	4,18	45,71	38,89	0,81
P10	0 (2)	0 (0,5)	+ OSR 2,5 g/L)	4,27	47,95	41,51	1,13
P11	0 (2)	0 (0,5)	0 (Coco 10 g/L	4,580	47,22	40,57	1,77
			+ OSR 2,5 g/L)				

Na Figura 22 está apresentado o diagrama de Pareto obtido para a variável concentração de células. A razão de aeração (RA) e concentração de sulfato de amônio (CN) foram estatisticamente significativos em um nível de confiança de 90%, sendo, portanto, as variáveis de maior influência no aumento da concentração de células.

É possível perceber que a razão de aeração (RA) exerce influência de sinal negativo, o que significa que valores menores de razão de aeração, ou seja, maior oxigenação para o microrganismo favorece o aumento da concentração de células. Enquanto que a concentração de sulfato apresenta influência de sinal positivo, o que indica que maiores concentrações acarretam em um aumento da concentração de células. O indutor e as combinações das demais variáveis não foram estatisticamente significativas. O maior valor de produção de

células foi obtido no experimento P2, em que foi obtida uma concentração c de 6,03 g/L utilizando uma concentração de sulfato de amônio de 3 g/L, razão de aeração de 0,33 e polpa de coco (20 g/L) como indutor.

Figura 22 - Diagrama de Pareto para a variável concentração de células.



A Tabela 12 apresenta os coeficientes da regressão para a concentração de células. Três termos foram estatisticamente significativos (em destaque) e foram utilizados para construir o modelo.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão para biomassa

	Coeficientes da regressão	<i>p</i>
Média	4,109427	0,000006
CN (1)	0,757663	0,007206
RA (2)	-0,793687	0,006107
I (3)	0,021788	0,891458
1x2	-0,080238	0,620807
1x3	-0,176612	0,303989
2x3	-0,002562	0,987179

Na Tabela 13 está mostrada a análise de variância para a concentração de células. A análise de variância é essencial para avaliar se o modelo matemático obtido é adequado para representar os dados experimentais obtidos (BARROS, 2007). Para verificar a validade do

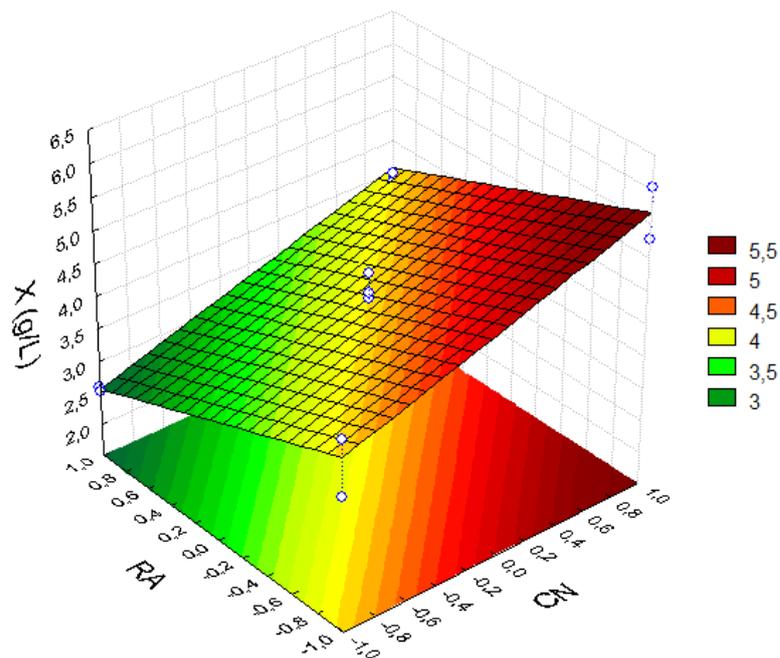
modelo foram considerados apenas os termos estatisticamente significativos. O modelo obtido é preditivo com um R^2 de 0,904, calculado pela razão entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados total. O F calculado obtido foi de 37,1, enquanto que o F tabelado é de 3,11. A razão entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ é de 11,93, então o modelo obtido para a concentração de células é estatisticamente significativo, e o modelo obtido pode ser usado na construção da superfície de resposta.

Tabela 13 - Análise de variância para a biomassa

Fonte de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	9,63	2	4,82	37,1
Resíduo	1,02	8	0,13	
Total	10,65	10		

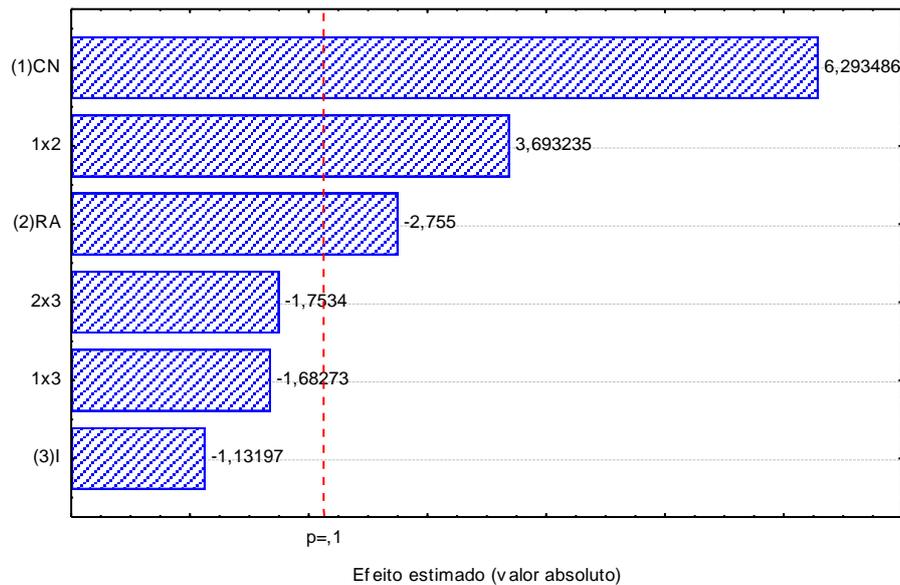
A superfície de resposta da variável concentração de células está apresentada na Figura 23. Para a construção da superfície foram utilizadas as variáveis independentes razão de aeração (RA) e concentração de sulfato de amônio (CN), fixando o Indutor no ponto inferior. A superfície apresentada mostra que os melhores resultados de concentração de células (g/L) estão na região mais escura do gráfico, ou seja, nos menores valores de razão de aeração e nas maiores concentrações de sulfato de amônio.

Figura 23 - Superfície de resposta da variável biomassa



Na Figura 24 está apresentado o diagrama de Pareto obtido para a variável índice de emulsificação em óleo de soja. A concentração de sulfato de amônio, a razão de aeração e a interação entre concentração de sulfato de amônio e razão de aeração foram estatisticamente significativas a 90% de confiança, sendo portanto às variáveis que mais influenciam no índice de emulsificação em óleo de soja.

Figura 24 - Diagrama de Pareto da variável índice de emulsificação em óleo de soja



A concentração de sulfato de amônio foi a variável independente que apresentou maior influência no índice de emulsificação em óleo de soja, sendo essa influência de sinal positivo, o que indica que maiores concentrações acarretam em uma maior índice de emulsificação. A razão de aeração exerce influência de sinal negativo, ou seja, quanto menor o volume de meio, maior a aeração e maiores índices de emulsificação. A interação entre estas variáveis é importante e apresenta sinal positivo, o que deve ter ocorrido pela maior influência da concentração de sulfato de amônia de sinal positivo.

O maior índice de emulsificação em óleo de soja obtido foi de 56,41% no experimento P4, utilizando 3 g/L de sulfato de amônio e polpa de coco como indutor. Os resultados obtidos nesse trabalho são próximos aos encontrados por Marim (2014) que no planejamento experimental executado obteve índice de emulsificação em óleo de soja de 58%. No trabalho de Oliveira (2014) foi observado pela ANOVA interferência da concentração de melão e do tempo de fermentação no índice de emulsificação em óleo de soja. Na concentração de 1% de melão, agitação de 100 rpm, temperatura de 45°C e 96h de cultivo foi obtido índice de emulsificação de 40-50%.

A Tabela 14 apresenta os coeficientes da regressão para o índice de emulsificação em óleo de soja. O modelo foi construído utilizando os quatro termos que foram estatisticamente significativos.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão para o índice de emulsificação em óleo de soja

	Coeficientes da regressão	<i>p</i>
Média	44,88182	0,000001
CN (1)	6,45625	0,003257
RA (2)	-2,82625	0,051111
I (3)	-1,16125	0,320906
1x2	3,78875	0,020959
1x3	-1,72625	0,167717
2x3	-1,79875	0,154401

O modelo gerado está mostrado na Equação 8. A concentração de sulfato de amônio é a variável estatisticamente significativa para o nível de confiança de 90%, com influência de sinal positivo, ou seja, é diretamente proporcional ao índice de emulsificação em óleo de soja. A razão de aeração apresenta influência negativa, sendo inversamente proporcional ao índice de emulsificação. A interação entre a concentração de sulfato de amônio e razão de aeração apresenta influência positiva.

$$IE - OS (\%) = 44,88 + 6,46 \text{ CN} - 2,83 \text{ RA} + 3,79 \text{ CN RA} \quad (8)$$

Na Tabela 15 está mostrada a análise de variância para a variável índice de emulsificação em óleo de soja. Para verificar a validade do modelo foram considerados apenas os termos estatisticamente significativos. O valor de R^2 obtido foi de 0,8447, o que mostra que o modelo não é capaz de explicar apenas 15,53% das variações. O F calculado obtido foi de 12,69, enquanto que o F_{tabelado} é de 3,07. Como $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ o modelo obtido para o índice de emulsificação em óleo de soja é estatisticamente significativo.

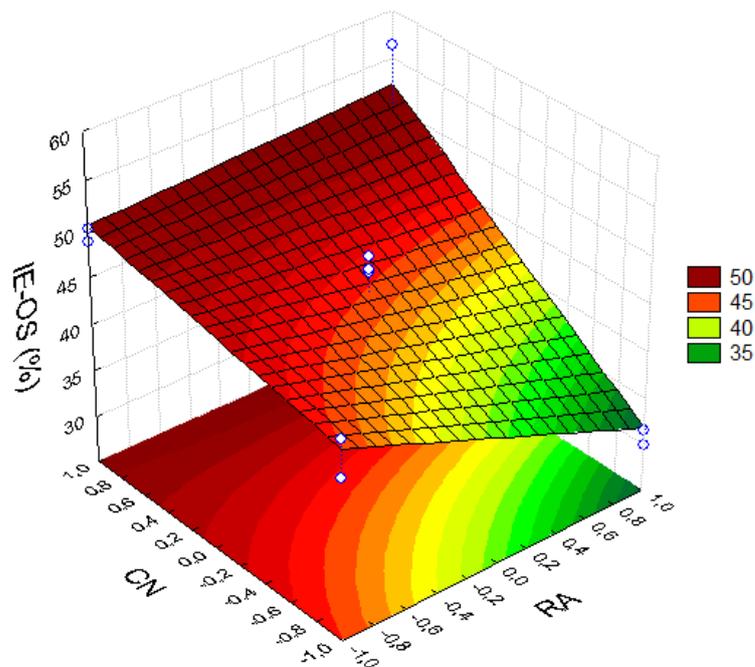
A superfície de resposta da variável índice de emulsificação em óleo de soja está apresentada na Figura 25. Para a construção da superfície foram utilizadas as variáveis independentes razão de aeração (RA) e concentração de sulfato de amônio (CN), fixando o Indutor (I) no ponto inferior. A superfície apresentada mostra que para baixas concentrações da fonte de nitrogênio a razão de aeração apresenta forte influência no índice de

emulsificação. Para concentrações mais elevadas de sulfato de amônio é possível obter elevadores valores de índice de emulsificação independente da razão de aeração utilizada.

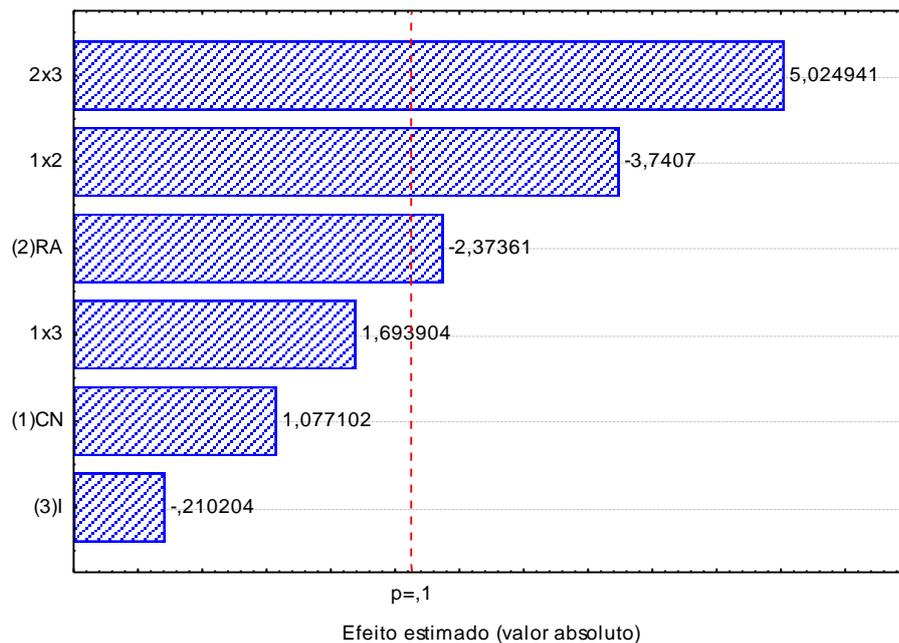
Tabela 15 - Análise de variância para o índice de emulsificação em óleo de soja

Fonte de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	512,20	3	170,73	12,69
Resíduo	94,19	7	13,45	
Total	606,39	10		

Figura 25 - Superfície de resposta da variável índice de emulsificação em óleo de soja



Na Figura 26 está apresentado o diagrama de Pareto obtido para a variável índice de emulsificação em querosene. A interação entre razão de aeração e indutor; a interação entre concentração de sulfato de amônio e razão de aeração e a razão de aeração foram estatisticamente significativas a 90% de confiança, assim têm maior influência no índice de emulsificação em querosene. O querosene é uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, aromático e naftênicos no intervalo de C12 a C16, sendo, portanto, mais complexo que o óleo de soja que apresenta até 57% de C18:2 e até 28% de C18:1.

Figura 26 - Diagrama de Pareto da variável índice de emulsificação em querosene

O maior índice de emulsificação em querosene obtido foi de 50,94% no experimento P2 em que utiliza concentração de sulfato de 3 g/L, razão de aeração de 0,33 e polpa de coco como indutor. No planejamento experimental realizado por Bezerra (2006) foi alcançado um índice de emulsificação máximo de 64,29% utilizando 0,2% de NaNO_3 , 2% de melão e razão de aeração de 0,5. Os resultados encontrados no presente trabalho foram superiores ao encontrado por Marim (2014) que obteve 8,34% de índice de emulsificação em querosene no melhor resultado do planejamento experimental realizado utilizando biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em meio com melão como substrato

A Tabela 16 apresenta os coeficientes da regressão para o índice de emulsificação em querosene. Quatro termos foram estatisticamente significativos e foram utilizados para a construção do modelo.

O modelo gerado está mostrado na Equação 9. A interação entre a razão de aeração e indutor mostra que a melhor condição é quando usa um menor volume de meio (RA -1) e polpa de coco (I -1), mas também pode ser quando usa OSR (I +1) e maior volume de meio (RA +1).

$$\text{IE} - \text{Q} (\%) = 36,23 - 3,87 \text{ RA} - 6,10 \text{ CN RA} + 8,19 \text{ RA I} \quad (9)$$

Tabela 16 - Coeficientes de regressão para o índice de emulsificação em querosene

	Coeficientes da regressão	p
Média	36,23545	0,000013
CN (1)	1,75500	0,342061
RA (2)	-3,86750	0,076519
I (3)	-0,34250	0,843782
1x2	-6,09500	0,020109
1x3	2,76000	0,165533
2x3	8,18750	0,007360

Na Tabela 17 está mostrada a análise de variância para a variável índice de emulsificação em querosene. Para verificar a validade do modelo foram considerados apenas os termos estatisticamente significativos. O F calculado obtido foi de 12,97, enquanto que o F_{tabelado} é de 3,07. Como $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ o modelo obtido para o índice de emulsificação em querosene é estatisticamente significativo. O R^2 do modelo foi de 0,8475.

Tabela 17 - Análise de variância para o índice de emulsificação em querosene

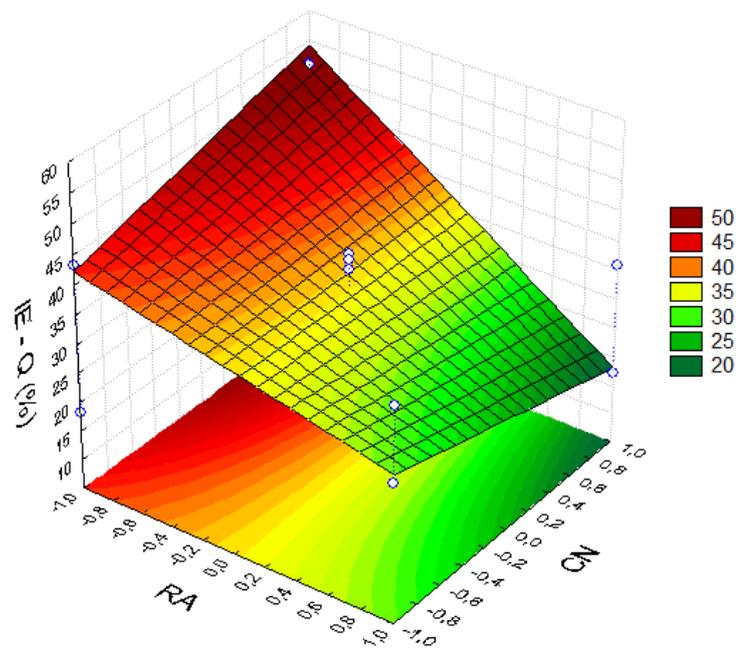
Fonte de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	953,13	3	317,71	12,97
Resíduo	171,48	7	24,50	
Total	1124,61	10		

A superfície de resposta da variável índice de emulsificação em querosene está apresentada na Figura 27. Para a construção da superfície foram utilizadas as variáveis independentes razão de aeração e concentração de sulfato de amônio, fixando o indutor no ponto inferior. A superfície apresentada mostra que o melhor resultado foi obtido utilizando uma menor razão de aeração, ou seja, uma maior oxigenação no meio, e uma maior concentração de sulfato de amônio.

O melhor índice de emulsificação em querosene foi alcançado no experimento P2, sendo esse valor de 50,94%. Resultados próximos ao encontrado nesse presente trabalho foram alcançados por Pryia e Usharani (2009), em que os autores obtiveram o melhor índice

de emulsificação em querosene como sendo de 52% utilizando um biossurfactante produzido por uma bactéria do gênero *Bacillus*.

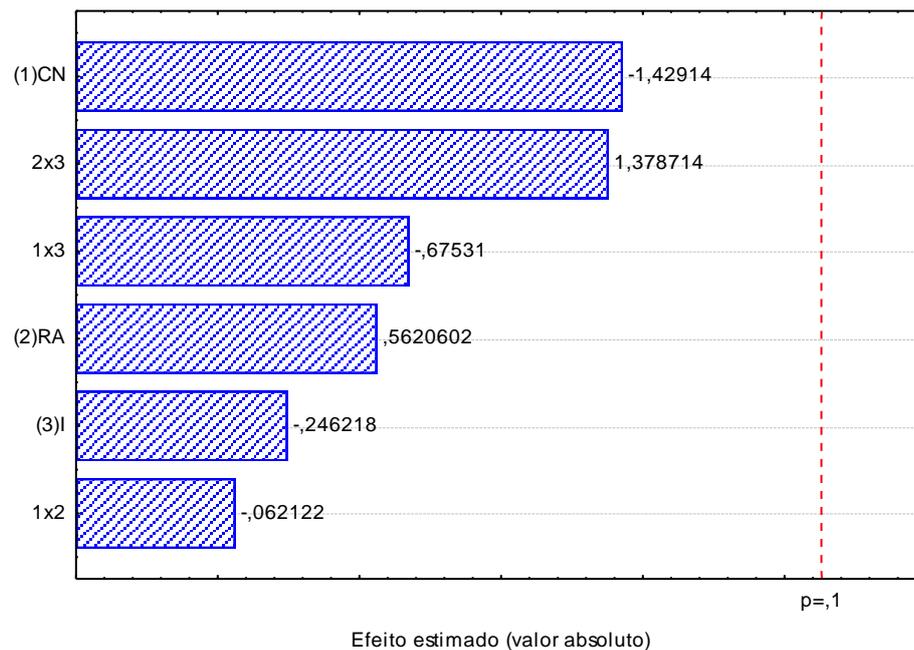
Figura 27 - Superfície de resposta da variável índice de emulsificação em querosene



Na avaliação da redução da tensão superficial nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa em um nível de confiança de 90%, conforme mostrado no gráfico de Pareto (Figura 29) e na Tabela 18. Assim, o comportamento da tensão superficial não foi preditivo, ou seja, o modelo obtido não é capaz de prever o valor de tensão superficial quando ocorre variação da concentração de sulfato de amônio, razão de aeração e indutor, impossibilitando sua utilização na construção da superfície de resposta.

Tabela 18 - Coeficientes de regressão para a redução da tensão superficial

	Coeficientes da regressão	<i>p</i>
Média	7,40161	0,071569
CN (1)	-5,09328	0,226172
RA (2)	2,00311	0,604078
I (3)	-0,87749	0,817633
1x2	-0,22139	0,953446
1x3	-2,40672	0,536505
2x3	4,91356	0,240066

Figura 28 - Diagrama de Pareto para a redução da tensão superficial

Foram realizados novos cultivos nas duas melhores condições encontradas: em meio de cultivo com melaço e polpa de coco com razão de aeração 0,33 e concentração de fonte de nitrogênio de 1 g/L de sulfato de amônio (experimento P1 do planejamento experimental); e em meio constituído por melaço e óleo de soja residual com razão de aeração de 0,67 e concentração de fonte de nitrogênio de 1 g/L (experimento P7 do planejamento experimental).

Os ensaios foram conduzidos utilizando essas duas condições, pois foram os melhores resultados de tensão superficial obtidos no planejamento experimental realizado. Embora não tenha sido possível gerar um modelo, foi possível chegar nessas duas composições que resultaram em uma efetiva redução da tensão superficial. Os ensaios foram conduzidos em 5 frascos individuais, para cada condição avaliada.

Na Tabela 19 estão apresentados os valores de tensão superficial média e desvio obtido para as melhores condições. Para o meio de cultivo com melaço e polpa de coco com razão de aeração 0,33 e concentração de fonte de nitrogênio de 1 g/L de sulfato de amônio foi obtida uma tensão superficial média de $52,6 \pm 1,2$ mN/m. Em meio constituído por melaço e óleo de soja residual com razão de aeração de 0,67 e concentração de fonte de nitrogênio de 1 g/L foi obtida uma tensão superficial média de $43,1 \pm 1,5$ mN/m.

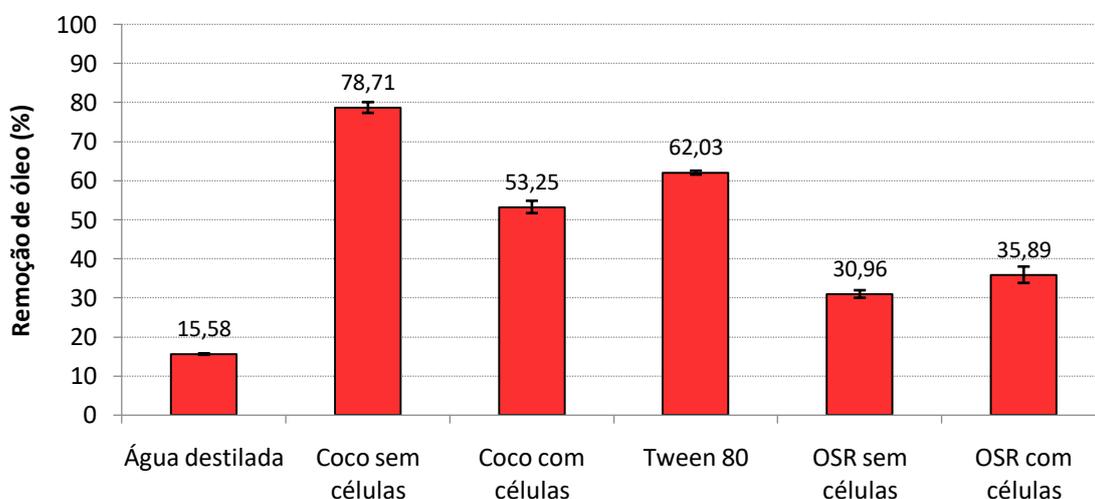
Tabela 19 - Tensão superficial média e desvio dos caldos brutos obtidos nas melhores condições

Meio	Tensão superficial média (mN/m)	Desvio médio
Melaço + coco	52,6	1,2
Melaço + OSR	43,1	1,5

4.6 TESTE DE REMOÇÃO DE ÓLEO DE MOTOR ADSORVIDO EM AREIA DA PRAIA

A avaliação do biossurfactante bruto produzido foi realizada por meio de teste de remoção de óleo de motor queimado adsorvido em areia da praia por um período de 5 dias, utilizando o caldo bruto contendo o biossurfactante produzido pela bactéria JS20 utilizando os dois meios que apresentaram as maiores reduções da tensão superficial. A areia utilizada nos testes foi previamente esterelizada por tindalização.

Os resultados obtidos (Figura 29) mostraram um bom potencial de remoção quando utilizado meio composto por melaço e polpa de coco como indutor, sendo a remoção obtida utilizando o caldo fermentado com a presença de células de $53,25 \pm 0,19$ % do óleo de motor adsorvido na areia. Com o caldo fermentado sem a presença de células o percentual obtido foi de $78,71 \pm 1,38$ %. Utilizando o tensoativo tween 80 foi possível remover $62,03 \pm 0,49$ %, enquanto que com a água foi possível remover apenas $15,58$ % do óleo adsorvido.

Figura 29 - Percentual de remoção de óleo adsorvido em areia

Já quando utilizado o meio composto com melão e óleo de soja residual nas condições descritas anteriormente foram obtidos percentuais de redução bem inferiores aos obtidos utilizando polpa de coco como indutor, sendo de $30,96 \pm 2,21$ % em meio sem a presença de células e de $35,89 \pm 1,79$ % em meio com a presença de células. Na Figura 30 está mostrado o aspecto da areia após o processo de remoção.

Costa et al. (2010 p.1513) afirmaram que há dois mecanismos associados com a remoção de óleos do solo: a mobilização e a solubilização. A mobilização acontece em concentrações abaixo da CMC e ocorre com a redução de tensões interfaciais e superficiais. Os surfactantes em contato com o sistema solo/óleo aumentam o ângulo de contato e reduzem a força capilar que mantém o óleo e o solo juntos, devido à redução da força interfacial. A solubilização ocorre acima da CMC dos surfactantes, pois a solubilidade aparente do óleo aumenta drasticamente devido à sua agregação dentro das micelas dos surfactantes. Dentro das micelas, a extremidade hidrofóbica das moléculas de surfactantes se agrupam formando um ambiente hidrofóbico capaz de solubilizar substâncias hidrofóbicas, enquanto a extremidade hidrofílica exposta à fase aquosa no exterior permite que toda a estrutura permaneça em solução.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram superiores aos obtidos no trabalho de Rovina (2018) que obteve um percentual de remoção de óleo de motor usado da areia de 31% utilizando um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* empregando resíduos do processamento da casca da laranja. Lima et al. (2010) estudaram a remoção de óleo de motor queimado adsorvido em solo empregando o biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi com óleo de girassol pós fritura. O percentual de remoção alcançado foi de 67% em solo contaminado com 10% de óleo de motor queimado e de 75,4% quando o percentual de óleo utilizado no solo empregado foi de 5%. Os estudos foram realizados empregando o caldo fermentado livre de células após 72 h de cultivo.

Figura 30 - Aspecto da areia adsorvida (A) antes do processo de remoção; (B) após remoção utilizando água destilada; (C) biossurfactante bruto com coco como indutor e com a presença de células; (D) biossurfactante bruto com coco como indutor e sem a presença de células; (E) Tween 80



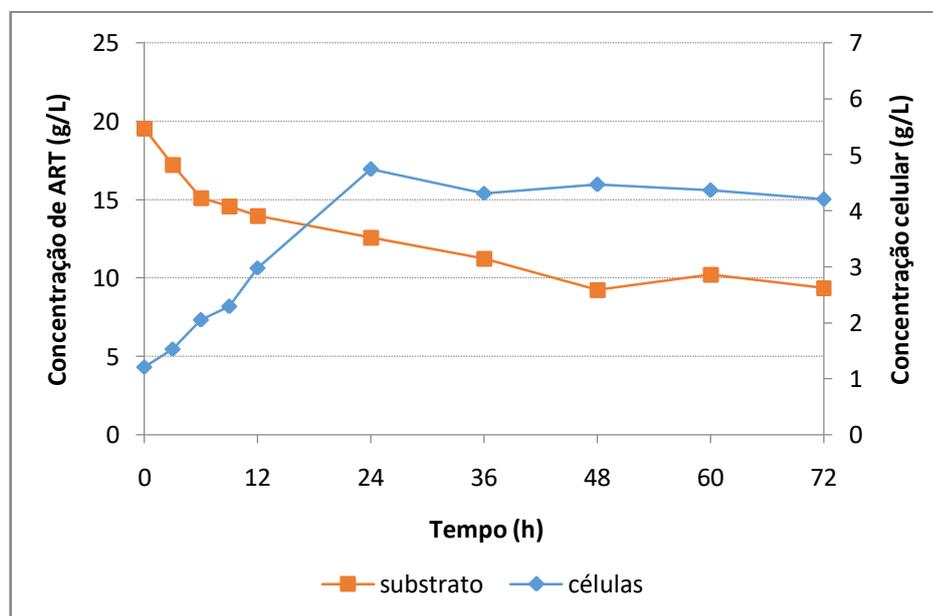
Com o biossurfactante produzido utilizando melão e polpa de coco como indutor foi possível obter um resultado superior àquele utilizando o tensoativo de origem química, o que é vantajoso por ser de origem biológica tornando-o menos agressivo ao meio ambiente, além de ser obtido empregando substratos de baixo custo, o que reduz os custos associados ao processo.

Os resultados obtidos mostram a eficácia do biossurfactante produzido, sendo possível a sua aplicação em processos de biorremediação.

4.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE CULTIVO NA MELHOR CONDIÇÃO

A Figura 31 apresenta a curva de crescimento celular e concentração de substrato ao longo de 72h de cultivo na melhor condição, que foi aquela em que foi obtido o melhor percentual de remoção de óleo adsorvido em areia. As condições utilizadas nesse cultivo foram a de concentração de sulfato de amônio de 1 g/L, razão de aeração de 0,33 e polpa de coco como indutor.

Figura 31 - Curva de crescimento celular e concentração de ART na melhor condição



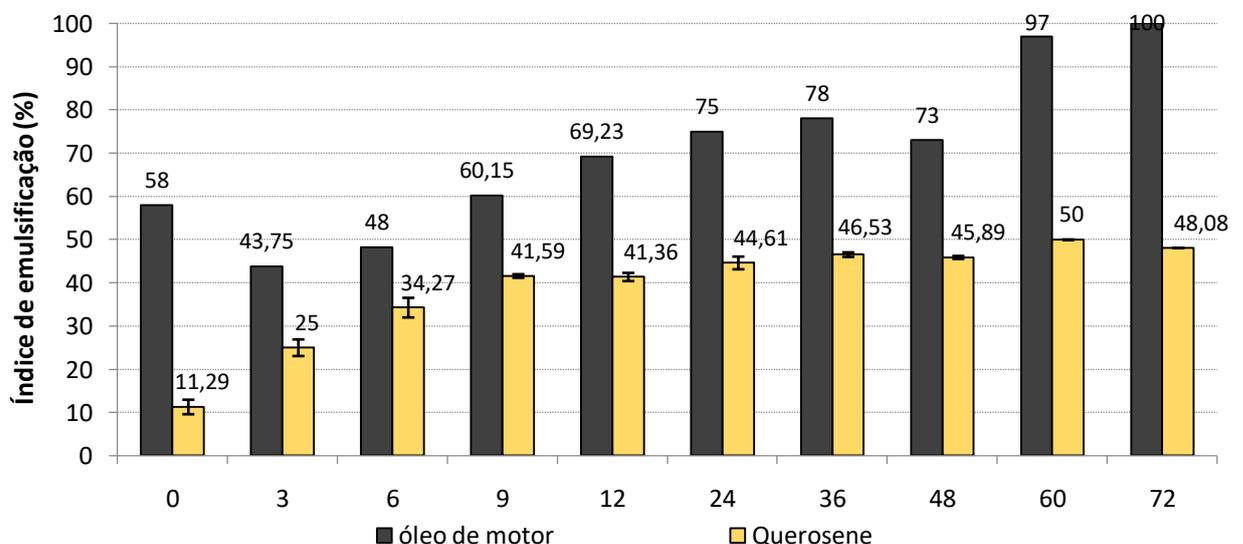
A concentração máxima de células foi obtida em 24h de cultivo, sendo esse valor de $4,74 \pm 0,15$ g/L. Em relação à concentração de substrato nota-se que ao final do cultivo ainda havia $9,37 \pm 0,21$ g/L de ART, o que indica um excesso de substrato necessário ao crescimento do microrganismo e consequentemente à síntese do biossurfactante.

A produtividade em biomassa e o fator de conversão de substrato em biomassa foram calculados para um tempo de 24h, em que houve o ponto máximo de crescimento. A produtividade em biomassa obtida foi de 0,147 g/Lh, velocidade máxima específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$, tempo de geração de 7,7 h e rendimento de substrato em biomassa de $0,50 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$.

Os resultados de índice de emulsificação em óleo de motor e querosene ao longo das 72h de cultivo estão mostrados na Figura 32. O biossurfactante produzido apresentou excelentes índices de emulsificação em óleo de motor alcançando 100% em 72h de cultivo. Em relação ao querosene o máximo valor obtido foi de 50% em 60h de cultivo. Rocha (2017) obteve um índice de emulsificação em querosene de 62% na melhor condição de cultivo (200 rpm, 36°C e razão de aeração de 0,4) utilizando um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* empregando melação de cana como substrato. Bezerra et al. (2012) encontrou valores de 50% a 68% utilizando manipueira como substrato com *Pseudomonas aeruginosa*.

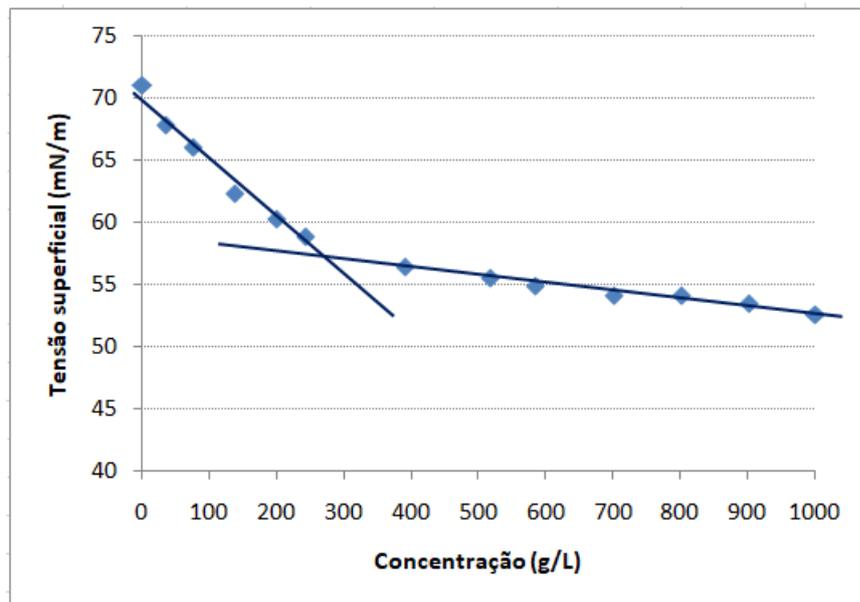
Foram realizados testes de tensão superficial do caldo livre de células obtido ao final do processo fermentativo. O biossurfactante reduziu a tensão da água de 72,2 mN/m para 52,6 mN/m. Embora a redução da tensão superficial não tenha sido tão expressiva, o biotensoativo produzido apresentou excelente capacidade de emulsificação e de remoção de óleo adsorvido em areia. Isso pode indicar que o biossurfactante produzido seja de alto peso molecular, também chamado de bioemulsificante, uma vez que estes são mais eficazes na formação de emulsões estáveis do que na redução de tensões (BANAT et al., 2010).

Figura 32 - Índice de emulsificação em óleo de motor e querosene ao longo de 72h de cultivo obtidos no estudo da melhor condição



A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante produzido foi determinada preparando soluções de concentrações variando de 0 a 1000 g/L utilizando o caldo fermentado livre de células e determinando a tensão superficial em cada um dos pontos. A CMC foi determinada a partir do ponto de inflexão da tensão superficial em função da concentração. O resultado obtido está mostrando na Figura 33. A CMC encontrada foi de 269,72 g/L. No trabalho de Silva (2016) foi encontrada uma concentração micelar crítica de 189 g/L utilizando o caldo fermentado produzido por *Pseudomonas aeruginosas*, que é uma bactéria conhecida por produzir biossurfactante com alto poder de redução de tensão.

Figura 33 - Concentração micelar crítica para o caldo fermentado livre de células obtido na melhor condição.



4.8 TESTE DE ESTABILIDADE

O teste de estabilidade foi realizado com o biossurfactante produzido utilizando meio composto por melaço e polpa de coco, pois foi o melhor resultado obtido na remoção de óleo adsorvido em areia. Para que a aplicação do tensoativo produzido seja possível é necessário que ele possa manter suas características em situações diversas. Para isso foram testados os efeitos de altas temperaturas, sendo avaliadas as temperaturas de 100 e 120°C. Salinidade variando entre 1 e 14% (m/v), além de pH entre 2 e 10 sobre a tensão superficial e o índice de emulsificação em óleo de motor.

A Tabela 20 mostra o efeito da temperatura na estabilidade do biossurfactante. Os resultados de índice de emulsificação mostraram que a temperatura de 100°C não provocou

alterações nas propriedades emulsificantes do biossurfactante produzido, mas quando submetido à temperatura de 120°C é possível perceber uma redução considerável no índice de emulsificação de 100% para $62,0 \pm 1,5$ %. Em relação à tensão superficial o biossurfactante apresentou boa estabilidade, apresentado um aumento médio de 1,1 mN/m para temperatura de 100°C e de 1,8 mN/m para temperatura de 120°C.

Tabela 20 - Efeito da temperatura na estabilidade do biossurfactante

Análise	Antes do tratamento térmico	Depois do tratamento térmico 100°C/15min	Depois do tratamento térmico 120°C/15min
Tensão superficial (mN/m)	$52,6 \pm 1,2$	$53,7 \pm 1,1$	$54,4 \pm 0,8$
Índice de emulsificação (%)	100 ± 0	100 ± 0	$62,0 \pm 1,5$

O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* empregando resíduos do processamento da casca de laranja não se mostrou estável nas temperaturas de 100 e 120°C (Ravina, 2018). Já no trabalho de Rocha et al (2007) o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* apresentou aumento da tensão quando submetido a uma temperatura de 121°C por 15 minutos. Fernandes (2016) produziu um biossurfactante por *Paenibacillus sp* empregando manipueira como meio de cultura que manteve suas propriedades tensoativas quando submetido a temperaturas de 100 e 120°C.

Na Figura 34 está apresentado o efeito de diferentes níveis de salinidade em relação à tensão superficial sobre a estabilidade do biossurfactante. Os resultados mostram que o biossurfactante se manteve estável até uma concentração de 6% (m/v) de NaCl, nas concentrações testadas acima desse valor é possível perceber um pequeno aumento na tensão superficial. Já na Figura 35 está apresentado o índice de emulsificação em diferentes níveis de salinidade. Até uma concentração de 6% de NaCl a atividade emulsificante permaneceu inalterada, a elevação progressiva da salinidade para níveis de 10% e 14% resultaram em uma pequena redução de 5% e 6,4%, respectivamente, do índice de emulsificação, mantendo ainda uma excelente emulsificação.

A tolerância do biossurfactante produzido à ampla faixa de concentrações de NaCl se apresenta como vantagem frente aos surfactantes convencionais, em que concentrações salinas de 2-3% é suficiente para provocar a sua inativação (Nitschke e Pastore, 2002). O biossurfactante produzido por Rovina (2018) se mostrou estável em ampla faixa de salinidade, variando de 2,5 a 10%. Santos (2016) produziu um biossurfactante por *Penicillium spulosom*

que manteve os valores de tensão superficial estáveis em toda a faixa de salinidade testada, variando entre 2 e 12%. A tolerância do biossurfactante à salinidade possibilita a sua aplicação em ambientes marinhos para derramamentos de óleos.

Figura 34 - Efeito da salinidade na estabilidade do biossurfactante em relação à tensão superficial

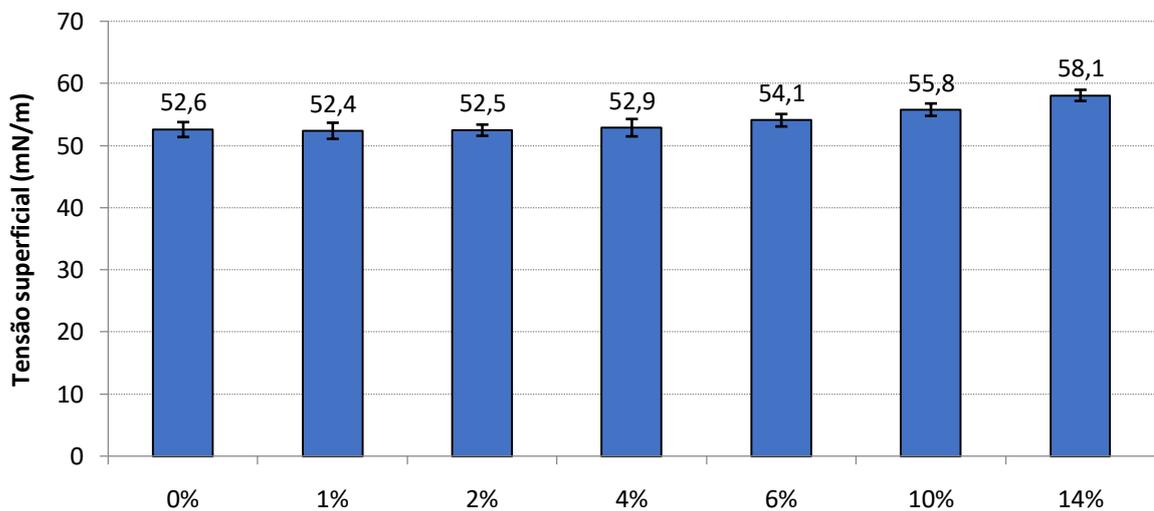
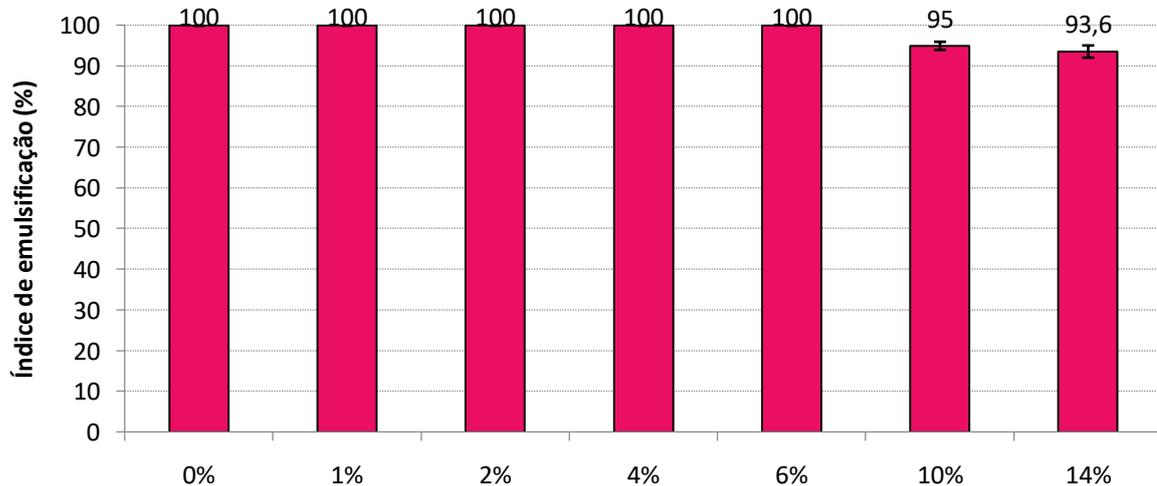


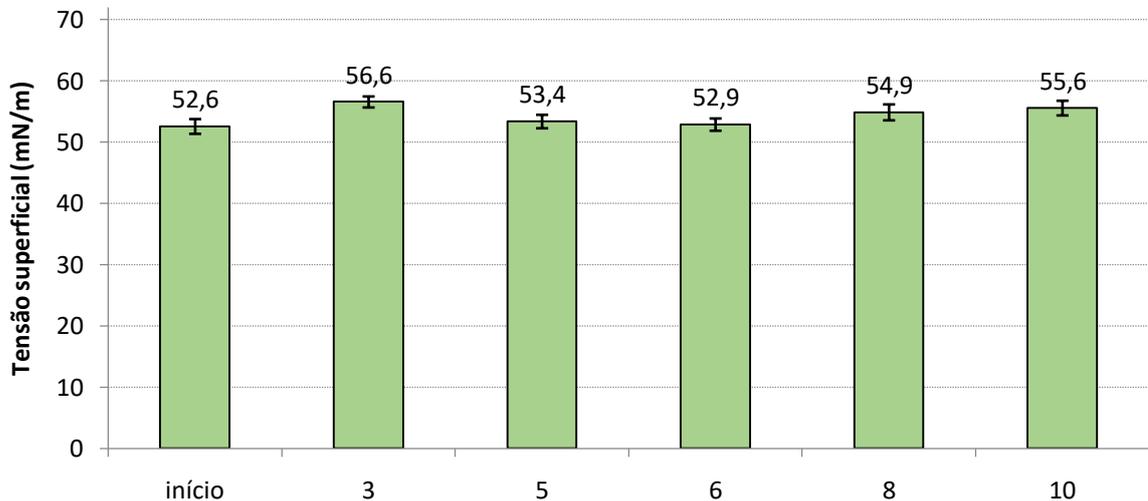
Figura 35 - Efeito da salinidade na estabilidade do biossurfactante em relação ao índice de emulsificação



A Figura 36 mostra o efeito do pH na estabilidade do surfactante em relação à tensão superficial. É possível perceber que houve pequenas variações na faixa de pH testado, sendo identificado os maiores valores de tensão de 56,6 mN/m para pH 3 e de 55,6 mN/m para pH 10. Já o índice de emulsificação permaneceu inalterado em toda faixa de pH testada. O

biossurfactante produzido por Rovina (2018) manteve-se estável em pH de 6 a 7 nas proporções de 1:1 e 1:2 de solução tampão fosfato e biossurfactante.

Figura 36 - Efeito do pH sobre a estabilidade do biossurfactante



4.9 TESTE DE TOXICIDADE

O biossurfactante produzido apresentou 100% de letalidade frente à *Artemia salina* em todas as concentrações testadas, ou seja, na metade da CMC, na CMC e em duas vezes a CMC. Silva (2016) encontrou resultados idênticos ao desse trabalho utilizando um biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Em contrapartida, no trabalho de Silva (2009), o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou toxicidade com *Artemia salina* quando empregado o líquido metabolito livre de células e em baixas concentrações do biossurfactante. Em concentrações elevadas o biossurfactante provocou letalidade de até 100%. Como os testes de toxicidade não foram realizados com o biossurfactante purificado, mas com o caldo bruto obtido ao final do processo fermentativo, a morte da *Artemia* pode ter sido causada por algum outro composto tóxico formado durante o processo de fermentação e não devido ao biossurfactante, uma vez que esses compostos são conhecidos pela sua baixa toxicidade. Além disso, outra possível causa que possa ter provocado a morte da *Artemia salina* pode ter sido a limitação de oxigênio.

5 CONCLUSÃO

Entre as 20 bactérias analisadas a que apresentou o melhor resultado foi a JS20, bactéria isolada do solo, que apresentou um percentual de redução da tensão superficial de 37,88 % em meio com glicose e óleo de soja residual e de 22,49% em meio formulado com melaço e óleo de soja residual.

O meio de cultivo contendo os sais sulfato de amônia, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico e sulfato de magnésio é melhor na obtenção de menores valores de tensão superficial que o meio com melaço sem os sais.

Dentre as fontes de carbono alternativas avaliadas os menores valores de tensão superficial foram obtidos em meio com melaço usando polpa de coco ou óleo de soja residual.

Das fontes de nitrogênio avaliadas o sulfato de amônio é o mais indicado pelo seu baixo custo.

O biossurfactante produzido na melhor condição (meio com melaço, polpa de coco como indutor, razão de aeração de 0,3 e concentração de sulfato de amônio de 1 g/L) apresentou excelente capacidade de emulsificação, com índice de emulsificação de 100% em óleo de motor após 72h de cultivo e de 50% em querosene em 60h.

O biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão da água de 72,2 para 52,6 mN/m; apresentou capacidade de remoção de 78,71% de óleo adsorvido em areia, resultado superior ao obtido com o surfactante químico Tween 80, que removeu 62,03%. Além disso, mostrou-se estável em ampla faixa de salinidade, pH e temperatura.

O biossurfactante produzido tem possível aplicação como emulsificante na indústria de cosmético na fabricação de shampoos, condicionadores e hidratantes. . Além disso, pode ser empregado em recuperação avançada de petróleo, na descontaminação de águas contaminadas com óleos e na remediação de solos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D.G.; SILVA, R. D. C. F. S.; LUNA, J. M., RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 157, 2017.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 6, 848-858, 2013.
- ARIMI, M. M.; ZHANG, Y.; GÖTZ, G.; KIRIAMITI, K.; GEIBEN, S. V. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n.87, p.34 a 43, 2014.
- BANAT, I.M. Biossurfactantes production and possible uses in microbial enhanced oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v.51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.
- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MAETINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 697, 2014.
- BANAT, I. M.; RIENZO, M. A. D.; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9915-9929, 2014.
- BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. Botucatu, 95f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P., MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 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**, v. 28, n. 4, 2008.
- BATISTA, I. H.; ALBUQUERQUE, C. C.; FERREIRA, F. S.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PEREIRA, J. O. Potencial para produção de biossurfactantes em bactérias isoladas de macrófita aquática na Amazônia. **Revista Científica do CESP/UEA**, n. 1, 2017.

BENUTO, B. C.; CORSINO, D. L. M., FLORENTINO, G. B.; REZENDE, M. I. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Biossurfactantes Provenientes de Solo e Turfa Contaminados com Petróleo. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 305-308, 2013.

BEZERRA, Márcio Silva. **Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato**. Natal, 101 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

BEZERRA, Márcio Silva. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por Pseudomonas aeruginosa AP029-GVIA utilizando manipueira como fonte de carbono**. Natal, 125 f. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de biotensioativo utilizando Pseudomonas aeruginosa (PA) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, v. 1, p. 14-27, 2012.

BRITO, I. P. **Caracterização e aproveitamento da água de coco seco (Cocus nucifera L.) na produção de bebidas**. Recife, 118f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

BUENO, G. F. **Produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. São José do Rio Preto, 138 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2014.

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

CALVO, C.; MANZANERA, M., SILVA-CASTRO; G. A., UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the total environment**, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015.

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.

CIAPINA, E. M. P. **Produção de Biossurfactante por Rhodococcus erythropolis em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo**. Rio de Janeiro, 122f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 122f.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two Bacillus species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COSTA, S. G.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

COSTA, S. G.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E., CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511-1516, 2010.

CURBELO, F. D. S. **Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos**. Natal, 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

DAMASCENO, S. **Cultivo de *Geotrichum fragans* em Manipueira**. Botucatu, 117f. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciência Agrônômicas, UNESP, Botucatu, 1999.

DATTA, S.; SAHOO, S.; DIPA, B. Optimization of culture conditions for biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. **J. Adv. Sci. Res**, v. 2, n. 3, p. 32-36, 2011.

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

ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T. S.; ALMAGHRABI, O. A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 4, p. 466-475, 2015.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactant from *Bacillusli* cheniformis for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing. **Egyptian Journal of Petroleum**, 24:155–162, 2015.

FARIA, A.F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**. Campinas, 157p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FERNANDES, I. S. **Produção de biossurfactante por *Paenibacillus* sp utilizando como meio de cultura a manipueira**. Salvador, 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

FIGUEIREDO, A. L. **Análise comparativa da produção de biossurfactantes utilizando *Serratia marcescens* UCP 1549**. Campina Grande, 45f. Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

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

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985-992, 2005

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: IAL, p. 1018, 2008.

KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, n. 31, p. 249-253, 2000.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.4, p.295-304, 2001.

LEAL, R.C.; BARROS, L.R.; MOUCHREK FILHO, V.E.; MENDES FILHO, N.E.; EVERTON, P.C.; LUZ, D.A. Estudo físico-químico da polpa de côco verde (cocos nucifera L.) in natura, comercializado em praias de São Luís-MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 53, 2013, Rio de Janeiro. Química dos Alimentos. **Anais**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, 2013.

LIANG, X.; SHI, R., RADOSEVICH, M.; ZHAO, F.; ZHANG, Y.; HAN, S.; ZHANG, Y. Anaerobic lipopeptide biosurfactant production by an engineered bacterial strain for in situ microbial enhanced oil recovery. **RSC Advances**, v. 7, n. 33, p. 20667-20676, 2017.

LIMA, C. J. B. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas Aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. Uberlândia, 190 f. Tese (Doutorado em Engenharias) - Produção de biossurfactante por *Pseudomonas Aeruginosa* empregando óleo de soja residual, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

LIMA, R. A.; ANDRADE, R. F. S.; SANTOS, L. Q.; TAKAKI, G. M. C. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Anana comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivados de petróleo. **Exacta**, v. 8, n. 2, 2010.

LIU, Y. P.; ZHENG, P.; SUN, Z. H.; Ni, Y.; DONG, J. J.; ZHU, L. L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1736-1742, 2008.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). *Advances Applied Microbiology* – v. 52. USA: Academic Press, 2003. Cap. 4, p. 101-121.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARIM, M. G. **Obtenção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC (9372) a partir de melão de cana-de-açúcar**. Campo Mourão, 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

MARIM, M. G.; LIMA, MVS; BONA, E. Otimização da obtenção de biosurfactante por bacillus subtilis atcc (9372) a partir de melão de cana-de-açúcar. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1303-1308, 2015.

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

MELO, W.C. **Aplicação de biosurfactante de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 na remoção de hidrocarbonetos de borra oleosa da indústria do petróleo**. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, R. K. S. Produção de biosurfactantes a partir de substratos de baixo custo. Maceió, 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

MUTTON, M. L. Z.; SOUZA, A. S. T.; FUZATTO, F. C.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. Uso de azolla caroliniana para produção de biogás. **Ciência & Tecnologia**, v. 7, 2015.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering geology**, v. 60, n. 1-4, p. 193-207, 2001.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings-Indian National Science Academy Part B**, v. 70, n. 1, p. 31-56, 2004.

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

OLIVEIRA, J. G. **Utilização de melão, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biosurfactante por *Bacillus Pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo**. São José do Rio Preto, 98f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014.

- PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** Rio Claro, 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2006
- PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**, v. 2, n. 4, p. 284-287, 2009.
- RAZA, Z. A.; AHMAD, N.; KHALID, Z. M.; AHMAD; NRAZA. Response surface optimization in biosurfactant production by using a renewable growth substrate. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 217-229, 2016.
- ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade de biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. 4º PDPETRO, Campinas, 2007.
- ROCHA, M. V. P. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional.** Fortaleza. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ROCHA, P. M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato.** Natal, 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017
- ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melão e manipueira.** Minas Gerais, 97f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- ROVINA, F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduos do processamento da casca da laranja e sua aplicação na remoção de óleo em solo contaminado.** Campinas, 80f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.
- RUFINO R. D.; LUNA J. M.; SARUBBO L. A.; RODRIGUES L. R. M., TEIXEIRA J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant *Rufisan* produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 84:1–5, 2011.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.
- SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA, N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1-9, p. 459-467, 2001.
- SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A. S.; PEREIRA JUNIOR, N.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactants from

Pseudomonas aeruginosa PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

SANTANA, I. N.; RIBEIRO, E. P.; IGUTI, A. M.. Evaluation of green coconut (*Cocos nucifera* L.) pulp for use as milk, fat and emulsifier replacer in ice cream. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1447-1453, 2011.

SANTANA, I. A. **Avaliação química e funcional de polpa de coco verde e aplicação em gelado comestível**. São Caetano do Sul, 107f. Dissertação (Mestrado em engenharia de processos químicos e bioquímicos), Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012.

SANTOS, D.K.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SANTOS, P. N. **Produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *penicillium spinulosum* (UCP1347) utilizando resíduos agroindustriais**. Recife, 63f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2016.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial** – Engenharia bioquímica. - Vol. 2 – Editora Edgard Blucher, 2001.

SILVA, F. S; MIRIAN, A. C.; BISPO, M. G. S; KREPSKY, N.;FONTANA, L. F.; PIMENTA, A. L.; SAVERGNINI, F; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, V. L. Produção de surfactante por bactérias coletadas em três substratos marinhos. 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003.

SILVA, M. A. S; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

SILVA, N. R. A. **Potencial biotecnológico de *cunninghamella echinulata* UCP 1297 na produção de biossurfactante por fermentação submersa**. Recife, 86f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D. LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.;SARUBBO, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 132-139, 2014.

SILVA, R. C. F. S. **Produção e formulação de biossurfactante de *Pseudomonas cepacia* UCP 6659 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados na indústria de petróleo**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SILVA, R. K. P. **Avaliação da produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* TGC01**. João Pessoa, 66f. Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SILVA, S. N. R. L. **Glicerol como substrato para a produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992**. Recife, 135 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Programa de Pós- Graduação em Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183, 2010.

SILVA, Vinícius Luiz da. **Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator**. Rio Claro, 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SOUSA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B; CRUZ, A. J. G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, Vol. 37, No. 3, 431-441, 2014.

SOUZA JÚNIOR, E. F. **Bactérias potencialmente produtoras de polidroxibutirato (PHB) e/ou enzimas, isoladas de solo e resíduo agroindustrial da usina Japungu no estado da Paraíba**. João Pessoa. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

TEIXEIRA, E. R. F. **Influência da acrilamida e da poliacrilamida em sistema microemulsionado visando aplicação na recuperação avançada de petróleo**. Natal, 188 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; DE ARAGAO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2013.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. **int. J. Mol. Sci**, v.11 p.5095-5108, 2010.

VALPUESTA, R. R. F. **Otimização da produção de biosurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-prima renovável e de baixo custo**. Rio de Janeiro, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

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

VELOSO, A. C. **Optimização de estratégias de alimentação para identificação de parâmetros de um modelo de E. coli. utilização do modelo em monitorização e controlo.** 249 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Minho, Portugal, 2007.