UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

FERNANDA ROVINA

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
2018

FERNANDA ROVINA

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *BACILLUS SUBTILIS* UTILIZANDO RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DA CASCA DA LARANJA E SUA APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE ÓLEO EM SOLO CONTAMINADO

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador: PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA ROVINA, E ORIENTADA PELO PROF. DR ELIAS BASILE TAMBOURGI.

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1281-7371

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

R769p

Rovina, Fernanda, 1991-
Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduos do processamento da casca da laranja e sua aplicação na remoção de óleo em solo contaminado / Fernanda Rovina. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biossurfactantes. 2. Fermentação. 3. Bacillus subtilis. 4. Surfactina. 5. Biorremediação. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biosurfactants production by *Bacillus subtilis* using residue from the processing of orange peel and their application in the oil removal in contaminated soil
Palavras-chave em inglês:
Biosurfactants
Fermentation
Bacillus subtilis
Surfactin
Biorremediation
Área de concentração: Engenharia Química
Titulação: Mestra em Engenharia Química
Banca examinadora:
Elias Basile Tambourgi [Orientador]
Laís Pellizzer Gabriel
Manoel Orlando Alvarez Mendez
Data de defesa: 18-07-2018
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Fernanda Rovina em 18/07/2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos Doutores:

_____

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Orientador

_____

Prof.ª Dra. Lais Pellizzer Gabriel

Membro

_____

Prof. Dr. Manoel Orlando Alvarez Mendez

Membro

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Aos meus pais, Silvana e Edmilson, por todo o amor e dedicação depositados em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me iluminar e dar forças durante os momentos mais difíceis e a Maria por sua presença serena.

Ao professor Elias Basile Tambourgi por ter me recebido de portas abertas, pela orientação, e ensinamentos prestados.

Aos meus pais, Edmilson e Silvana, por todo carinho, dedicação e ajuda nos momentos mais difíceis.

À Daniela, que colaborou no desenvolvimento desta tese e me ajudou na resolução de cada problema apresentado.

Aos meus colegas do laboratório de Processos de Separação II, Jorge, Natalia, Nathiele e Gabrielle pelos momentos compartilhados.

Aos amigos que conquistei nesta jornada: Raiza, Luiz Henrique, Lorrane, Flavio e Larissa por muitos momentos prazerosos e por toda disponibilidade que vocês sempre tiveram em me ajudar.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com a realização de mais esta etapa da minha vida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Os biossurfactantes são produzidos naturalmente por microrganismos e podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis com grande diversidade química. Por serem compostos com características anfipáticas, os surfactantes tendem a alterar as propriedades interfaciais e superficiais dos fluidos ocasionando a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação e solubilização. Os biossurfactantes possuem biodegradabilidade e baixa toxidade, porém sua produção tem sido limitada devido aos altos custos de produção e purificação. O presente trabalho teve como objetivo a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em meio de fermentação a base de resíduos do processamento da casca da laranja, a 37°C durante 24 horas. A partir do método do peso da gota, após 24 horas de fermentação, obteve uma redução da tensão superficial de 25 %, utilizando substrato diluído em 40 %. O maior índice de emulsificação constatado foi após 9 horas de fermentação, chegando a 29 % quando utilizado o querosene e 11 % com o óleo de soja. Foi observado estabilidade do biossurfactante quando exposto a faixa de pH de 6,0 a 7,0 nas concentrações 1:1 e 1:2 (solução tampão fosfato: biossurfactante), atingindo uma redução da tensão superficial de aproximadamente 20 %, quanto a estabilidade frente à força iônica, em concentrações de 2,5%, 5% e 10% de solução de NaCl foi obtido redução da tensão superficial maiores que 20 %. No entanto não foi observado estabilidade do biossurfactante quando expostos a condições de temperatura (100° C e 121° C). O teste de biorremediação foi favorecido pelo uso do biossurfactante produzido, no qual foi capaz de remover 31 % do óleo de motor da areia.

Palavras chaves: Biossurfactante, fermentação, *Bacillus subtilis*, surfactina, biorremediação.

ABSTRACT

The biosurfactants are naturally produced by microorganisms and can be synthesized from renewable substrates with large chemical diversity. Because they are compounds with amphipathic molecules, the surfactants tend to change the interfacial and surface properties of fluids causing the ability of detergency, emulsification, lubrication solubilization. The biosurfactants have high biodegradability and low toxicity, however the biosurfactants production has been limited due to high costs of production and purification. This study aimed to produce biosurfactant by Bacillus subtilis at 37 °C for 24 hours, using the residue from processing of in orange peel. From the drop weight method, the fermentation held 40% diluted in substrate, obtained a reduction of surface tension of 25 % after 24 hours of fermentation. This fermentation obtained the highest percentage of emulsification after 9 hours of fermentation, reaching 29 % when used kerosene and 11 % with soybean oil. Biosurfactant stability was observed when exposed to a pH range of 6.0 to 7.0 at concentrations 1: 1 and 1: 2 (phosphate buffer: biosurfactant), reaching a reduction of surface tension of approximately 20 %, as for stability of the ionic strength, in the concentrations of 2,5 %, 5 % and 10 % of NaCl solution was obtained an reduction of surface tension greater than 20 %. However, no stability of the bisurfactant was observed when exposed to temperature conditions (100° C and 121° C). The bioremediation test was favored by the use of the biosurfactant produced, in which it was able to remove 31 % of the motor oil from the sand.

Key words: Biosurfactant, fermentation, *Bacillus subtilis*, surfactin, biorremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do soforolipídeo produzido por *Candida bombicola*. 31

Figura 2- Estrutura do ramnolipídeo produzido por *Pseudoma aeruginosa.* 31

Figura 3- Estrutura da surfactina produzida por *Bacillus subtilis.* 32

Figura 4- Estrutura da fosfatidiletanolamina produzido por *Acinetobacter sp.* 34

Figura 5- Estrutura do ácido graxo produzido por *Corynebacterium sp*. 34

Figura 6- Estrutura do emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*. 35

Figura 7- Produção e produtividade da laranja no Brasil. 38

Figura 8- Produção mundial de suco de laranja (.1000 T)..... 38

Figura 9- Fluxograma da produção de biossurfactante. 42

Figura 10- Curva de Calibração de BSA. 44

Figura 11- Sistema utilizado para a medida da tensão superficial. 45

Figura 12- Dependência entre o fator de correção (f) e a razão ($r/V^{1/3}$). 46

Figura 13- Amostras contaminadas tratadas com biossurfactante e água destilada. 48

Figura 14- Amostra incubada durante 24 horas. 49

Figura 15- Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato diluído em 60%..... 51

Figura 16- Análise da média da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato diluído em 40%. 52

Figura 17- Análise da tensão superficial após exposição das amostras à temperatura de 100 °C e 121 ºC. 56

Figura 18- Análise da tensão superficial após exposição das amostras à diferentes faixas de pH nas proporções 1:1 e 1:2. 59

Figura 19- Análise da tensão superficial após exposição das amostras à diferentes faixas de força iônica nas proporções 1:1 e 1:2. 61

Figura 20- Comparativo da remoção do óleo de motor na areia contaminada utilizando biossurfactante e com água destilada. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais aplicações dos biossurfactantes. 29

Tabela 2- Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos na sua produção. 30

Tabela 3- Equipamentos utilizados..... 40

Tabela 4- Reagentes utilizados. 41

Tabela 5- Valores de tensão superficial ao longo do tempo com o substrato diluído em 60%..50

Tabela 6- Valores de tensão superficial ao longo do tempo com o substrato diluído em 40%..52

Tabela 7- Índice de emulsão de acordo com a relação óleo/biossurfactante, com substrato diluído em 40%..... 54

Tabela 8- Valores da tensão superficial do biossurfactante após variação de temperatura. 56

Tabela 9- Redução da tensão superficial comparada a tensão superficial no tempo zero da fermentação, exposto a temperatura de 100 °C. 57

Tabela 10- Redução da tensão superficial comparada a tensão superficial no tempo zero da fermentação, exposto a temperatura de 121 °C. 57

Tabela 11- Valores da tensão superficial do biossurfactante após variação do pH nas duas proporções. 58

Tabela 12- Redução da tensão superficial obtida após variação de pH na proporção 1:1..... 59

Tabela 13- Redução da tensão superficial obtida após variação de pH na proporção 1:2..... 60

Tabela 14- Valores da tensão superficial do biossurfactante após variação a força iônica nas duas proporções. 61

Tabela 15- Redução da tensão superficial obtida após variação da força iônica na proporção 1:1. 62

Tabela 16- Redução da tensão superficial obtida após variação da força iônica na proporção 1:2. 62

Tabela 17- Tensão superficial de pré- fermentação e após 24 horas de fermentação..... 63

Tabela 18- Tensão superficial- Teste de biorremendiação. 64

Tabela 19- Remoção do óleo de motor na areia contaminada. 64

Tabela A 1- Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo- 1ª Fermentação. 76

Tabela A 2- Dados da tensão superficial- 1ª Fermentação. 76

Tabela B- Dados da tensão superficial- 2ª Fermentação..... 76

Tabela C 1- Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo- 1ª Fermentação 77

Tabela C 2- Dados da tensão superficial- 1ª Fermentação 77

Tabela C 3- Dados do índice de emulsão- 1ª Fermentação 77

Tabela D 1- Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo- 2ª Fermentação 78

Tabela D 2- Dados da tensão superficial- 2ª Fermentação..... 78

Tabela D 3- Dados do índice de emulsão- 2ª Fermentação 78

Tabela E 1- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade térmica- 100° C 79

Tabela E 2- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade térmica- 121° C 79

Tabela E 3- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à variação de pH- Proporção 1:1..... 79

Tabela E 4- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à variação de pH- Proporção 1:2..... 80

Tabela E 5- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à força iônica Proporção 1:1 80

Tabela E 6- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à força iônica Proporção 1:2. 80

Tabela E 7- Dados da tensão superficial- Teste de biorremediação 80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

1.1 Objetivos 19

1.1.1 Objetivo Geral 19

1.1.2 Objetivos Específicos 19

2. REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1 Surfactantes 20

2.2 Biossurfactantes 21

2.2.1 Propriedades fisiológicas dos Biossurfactantes 22

2.2.1.1 Tensão Superficial 22

2.2.1.2 Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos 23

2.2.1.3 Tolerância a diferentes condições de temperatura, pH e força iônica 24

2.2.1.4 Transporte de hidrocarbonetos e aderência/liberação da célula de superfícies pela excreção de biossurfactantes 24

2.2.1.5 Atividade antibiótica 24

2.2.2 Aplicações dos Biossurfactantes 25

2.2.2.1 Biorremediação 25

2.2.2.2 Limpeza de reservatórios de óleo 26

2.2.2.3 Fármacos 26

2.2.2.4 Cosméticos 27

2.2.2.5 Alimentos 27

2.2.2.6 Agricultura 28

2.2.3 Classificação dos Biossurfactantes 29

2.2.3.1 Glicolipídeos 30

2.2.3.2 Lipopeptídeos e lipoproteínas 32

2.2.3.3 Fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros.....33
2.2.3.4 Poliméricos e particulados.....34
2.3 Produção de Biossurfactantes 35
2.3.1 Microrganismos.....36
2.3.2 Meios de Cultura.....36
2.4 Resíduos da Laranja 37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....40
3.1 Material.....40
3.2 Métodos.....41
3.2.1 Microrganismo 41
3.2.2 Produção de Biossurfactante 41
3.2.2.1 Preparo do Inóculo.....42
3.2.2.2 Preparo do Meio de Cultura.....43
3.2.2.2.1 Determinação da Concentração de Proteínas Totais……...……...…43
3.2.2.3 Fermentação.....44
3.2.3 Medida da Tensão Superficial 45
3.2.4 Índice de Emulsão (E_{24}).....46
3.2.5 Testes de Estabilidade 47
3.2.5.1 Estabilidade Térmica.....47
3.2.5.2 Estabilidade frente ao pH.....47
3.2.5.3 Estabilidade frente à força iônica.....48
3.2.6 Remoção de Óleo em Solo Contaminado.....48
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....50
4.1 Tensão Superficial 50
4.2 Índice de Emulsão.....53

4.3 Testes de Estabilidade 55
4.3.1 Estabilidade térmica 55
4.3.2 Estabilidade frente ao pH 58
4.3.3 Estabilidade frente à força iônica 60
4.4 Remoção de Óleo em Solo Contaminado 63
5. CONCLUSÃO 66
6. TRABALHOS FUTUROS 67
REFERÊNCIAS 68
ANEXOS 76
ANEXO A 76
ANEXO B 76
ANEXO C 77
ANEXO D 78
ANEXO E 79

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. Estes compostos reduzem a tensão superficial, formam micro emulsões e promovem a dispersão de hidrocarbonetos nas soluções aquosas, tornando os surfactantes adequados para as aplicações industriais que envolvem as propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Barros, 2008).

Devido a ampla utilização de compostos tensoativos pela indústria, o mercado mundial dos surfactantes atingiu cerca de 30,65 bilhões de dólares em 2015, e estima-se que esse valor ultrapasse 39,69 bilhões de dólares até o ano de 2021 (Rocha, 2017).

Os surfactantes podem ser sintetizados por rota química a partir de derivados do petróleo ou pela via biotecnológica utilizando microrganismos e matéria-prima renovável (Nitschke e Pastore, 2002). Os surfactantes sintéticos são economicamente vantajosos, mas provocam maior impacto ambiental por possuírem adição de fosfatos em suas estruturas, que apesar de seu baixo custo e capacidade de aumentar o poder tensoativo, são responsáveis por favorecer o crescimento excessivo de algas, causando a eutrofização das águas (Kogawa *et al*., 2017; Rocha, 2017).

Nas últimas décadas, a preocupação ambiental e o surgimento de novas legisçações influenciaram o aumento na procura por biossurfactantes, produzidos a partir do metabolismo de alguns microrganismos aeróbicos como bactérias, fungos e leveduras (Oliveira *et al.,* 2015). Os biossurfactantes possuem as vantagens de serem biodegradáveis, com baixa toxicidade e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (Pereira *et al*., 2013; Oliveira *et al*., 2015). Estes atuam na redução da tensão superficial, na interface das emulsões e são estáveis quando exposto a diferentes faixas de temperatura e pH (Barros *et al*., 2008).

Aliando as vantagens com as propriedades funcionais dos biossurfactantes produzidos por diversos microrganismos, podem ser aplicados em diversos setores, nos quais se destacam o uso na indústria petrolífera, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos e remoção de resíduos de óleo em tanques de estocagem (Nitschke e Pastore, 2002). Além disso, mostram ser promissoras o uso nas indústrias de alimentos, cosméticos e

fármacos, uma vez que, os biossurfactantes, em geral, possuem baixa toxidade e podem ser sintetizados utilizando microrganismos não patogênicos (Ferreira et al., 2017).

Diversos microrganismos são relatados como produtores de vários tipos de biossurfactantes podendo ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos/lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros, além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Desai e Banat, 1997; Nitschke e Pastore, 2002; Pereira et al., 2013). No entanto, os lipopeptídeos, estão entre os mais efetivos e eficazes na redução de tensão superficial e interfacial, sendo a surfactina, produzida pelo *Bacillus subtilis*, um dos biossurfactantes mais potentes já relatado (Barros *et al*., 2008).

A produção de biossurfactante possui o desafio de ter elevado custo, quando comparada com os equivalentes sintéticos. Um grande número de fontes de carbono, tais como os açúcares e os óleos são descritos, como atraentes substratos para a produção de biossurfactantes (Luna *et al*., 2009).

Para a ampliação das possibilidades de aplicação, o uso de resíduos industriais ou orgânicos como meio de cultivo é uma alternativa viável, uma vez que a matéria-prima representa cerca de 30% de custos totais em um processo biotecnológico e esses resíduos quando descartados no ambiente, podem apresentar problemas de disposição final e potencial poluição (Pontes, 2009).

A qualidade do biossurfactante produzido por um microrganismo pode ser influenciada pela fonte de carbono, concentrações de nutrientes, tais como, nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, enxofre e manganês no meio e as condições de crescimento, tais como pH, temperatura, agitação e concentração de oxigênio disponível (Morais, 2012). Entre os resíduos orgânicos já estudados, como meio de cultura para a produção dos biossurfactantes, se destacam o uso de diversas cascas de frutas, melaço, manipueira e óleos residuais de frituras, de girassol e de semente (Bezerra, 2012; Ehrhardt 2015; Nitschke e Pastore, 2002; Soares, 2014; Zhang *et al*., 2016).

A utilização do resíduo das cascas da laranja para a obtenção do substrato se torna viável, uma vez que o Brasil se destaca pela produção da fruta e atualmente é o detentor de metade da produção mundial de suco de laranja, o que gera grande quantidades de resíduos ricos em óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais que são descartados diariamente e possuem potencial para ser aplicado como matéria-prima em diversos produtos fermentados, óleos essenciais, fertilizantes orgânicos e compostos antioxidantes com alto valor agregado (Santos, 2015).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Utilizar o resíduo do processamento da casca da laranja como meio de cultivo para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, avaliando a viabilidade do processo de fermentação quanto a tensão superficial e índice de emulsificação.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido quando exposto à altas temperaturas, frente à variação do pH e da força iônica.
- Analisar a ação do biossurfactante e a sua efetividade no tratamento de solos contaminados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas formadas por uma extremidade hidrofílica ou polar, no qual pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica e uma extremidade hidrofóbica ou apolar, frequentemente constituída por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas, grupos policíclicos ou aromáticos (Soares, 2014). Devido a estas características estruturais, os surfactantes podem alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido, agindo na ruptura do limite entre duas fases imiscíveis (Barros *et al*., 2007).

Estes compostos tensoativos representam uma das mais importantes classes de produtos químicos industriais em volume de produção (Van Bogaert *et al*., 2007). A produção e uso global dos tensoativos são continuamente crescentes, estima- se que no ano de 2015 o mercado atingiu cerca de 30,65 bilhões de dólares, sendo os EUA, a China, a Europa Ocidental e a Ásia responsáveis pela maior taxa de consumo de surfactantes (Rocha, 2017; Klatyik *et al*., 2017).

Os surfactantes possuem diversas aplicações industriais, como o uso na indústria petrolífera, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção de resíduos de óleo em tanques de estocagem, indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos (Ferreira *et al*., 2017). Grande parte dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados do petróleo, os quais causam impactos ao ambiente. Devido ao crescente interesse da população na substituição de produtos industriais convencionais por processos sustentáveis, torna-se viável os estudos voltados para a produção de tensoativos de origem biológica, visando o equilíbrio entre o valor real e o valor social do processo (Nitschke e Pastore, 2002).

A principal vantagem significativa do uso de biossurfactantes sobre os surfactantes sintéticos é a possibilidade de produção utilizando substratos com menor valor, e geralmente reaproveitando resíduos industriais ou agroindustriais, o que reduz os custos de produção e os torna economicamente viável. O uso de resíduos agroindustriais também é ecologicamente correto, pois elimina problemas relacionados ao armazenamento, tratamento e disposição desses resíduos.

2.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são metabólitos que possuem estrutura anfifílica dos surfactantes sintéticos. A porção hidrofílica é constituída por carboidratos, aminoácidos, ácido carboxílico, álcool, fosfato, ou por um peptídeo cíclico. Já sua porção hidrofóbica é constituída de ácido graxos de cadeia longa, ou de hidroxiácidos. Esses compostos biotensoativos podem ser classificados de acordo com sua natureza bioquímica ou com a espécie microbiana produtora (Nitschke e Pastore, 2002; Soares, 2014).

O microrganismo pode sintetizar uma grande variedade de biossurfactante tanto de massa molecular alta como baixa. Os ácidos graxos, glicolipídeos e lipopeptídeos são exemplos de biossurfactante de baixo peso molecular. Já os poliméricos, particulados, e lipoproteínas são exemplos de biossurfactantes de alto peso molecular (Bueno, 2008).

Os biossurfactantes são compostos com baixa toxidade e responsáveis por reduzir a tensão superficial e interfacial, atuando na perturbação do equilíbrio de duas fases químicas, ocasionando a formação de gotas e bolhas e imiscibilidade entre líquidos polares e apolares (Gajewski, 2017). Por serem facilmente degradáveis na água e no solo, são aplicados em processos de biorremediação e tratamentos residuais, além de possuírem potencial aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (Ferreira et al., 2017; Nitschke e Pastore, 2002).

Diversos estudos além de comprovarem a produção de biossurfactante pelos métodos do índice de emulsificação e medida da tensão superficial, avaliaram a estabilidade dos biossurfactantes em diferentes condições de temperatura, pressão, força iônica, pH e presença de solventes orgânicos e mostraram haver significativa estabilidade dos biossurfactantes mesmo quando comparados a compostos sintéticos utilizados industrialmente (Barros *et al*., 2007; Khopade *et al*., 2012, Nitschke e Partore, 2006; Soares, 2014).

Khopade *et al*., (2012) avaliaram a estabilidade do biossurfactante produzido, utilizando cepas de *Nocardiopsis B4,* em uma faixa de pH entre 4 e 12, temperaturas de 4 a 60ºC e adição de cloreto em concentrações de 1-10% (m/v). Quando submetido a diferentes temperaturas houve uma variação na redução da tensão superficial de 55 a 75 mN/m, já a tensão superficial se mostrou estável às mudanças de pH entre pH 8 e 12, com maior estabilidade com pH alcalino do que às condições ácidas. Com pH 12, o índice de emulsão chegou a quase 50%, e abaixo do pH 7 reduziu para 30%. Em relação a salinidade, houve uma

maior estabilidade na tensão superficial quando exposto a concentrações de 4 a 10%, de 55 a 65 mN/m.

2.2.1 Propriedades fisiológicas dos Biossurfactantes

Em função da presença das porções polar e apolar na mesma molécula, os surfactantes e biossurfactantes tendem a alterar as estruturas interfaciais e superficiais dos fluidos ocasionando algumas propriedades fisiológicas, entre elas se destacam a redução da tensão superficial, poder emulsificante, transporte de hidrocarbonetos e aderência/liberação da célula de superfícies pela excreção de biossurfactantes, atividade antibiótica e biorremediação de solos contaminados (Nitschke e Pastore, 2002).

2.2.1.1 Tensão Superficial

A molécula de um surfactante é composta por uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, que confere a propriedade de interagir com compostos aquosos e orgânicos, permitindo a dupla solubilidade e a estabilização na interface entre dois líquidos (Barros *et al*., 2007). Quando exposto à compostos polares, como a água, as moléculas do surfactante tendem a se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre a parte hidrofóbica da molécula e a água. Os grupos polares ficam na solução aquosa, próximo à superfície, e os grupos apolares ficam na interface água/ar, diminuindo o contato com a água, o que gera uma redução na tensão superficial, o processo similar ocorre quando se adiciona compostos apolares, como os óleos, nos surfactantes (Morais, 2012).

A eficácia de um surfactante sintético ou biológico é determinada principalmente por sua capacidade em diminuir a tensão superficial. A tensão superficial é medida através da energia superficial livre por unidade de área utilizada para trazer a molécula para a superfície, ou seja, a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial (Barros *et al.*, 2008). A mensuração da tensão superficial pode ser realizada utilizando tensiômetros ou o peso da gota (Behring, 2004)

O biossurfactante pode reduzir a tensão interfacial de soluções aquosas à faixa de 40 a 20 mN/m (Cooper e Goldenberg, 1987).

Santos *et al*., (2016), mediram a redução da tensão do biossurfactante produzido a partir da fermentação do *Bacillus subtilis*, utilizando como substratos diversos materiais, tais como, glicerina, água residual do processamento de batatas, água da maceração do milho e óleo de fritura. Após a adição do biossurfactante produzido, a tensão da água caiu de aproximadamente 71 mN/m para 31 mN/m, comprovando a ação tensoativo do biossurfactante produzido.

2.2.1.2 Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos

Devido ao poder tensoativo, os biossurfactantes possuem a propriedade de emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando e mantendo a dispersão de um líquido em outro (Nitschke e Pastore, 2006). Essa propriedade é fundamental para os processos de biorremediação, pois garantem a emulsificação das moléculas hidrofóbicas no meio aquoso, tornando possível o crescimento de microrganismos nestes meios contaminados com óleo (Morais, 2012).

Ali Khan *et al*., (2017) estudaram a atividade de emulsão na presença de óleo diesel utilizando cepas bacterianas *Pseudomonas poae* com substratos ricos (NB) e pobres em nutrientes suplementado com diesel (BHB). A cepa bacteriana obteve índice de emulsificação significativamente maior que 52 % em NB e 48 % em BHB. O biossurfactante produzido pelas estirpes bacterianas formou emulsão estável à temperatura ambiente, que se manteve estável durante um mês.

Barakat *et al*., (2017) produziram biossurfactante utilizando diversos isolados com substratos salinos suplementado com: sulfato de magnésio 0,2 g/l, fosfato dipotássico 1,0 g/l, nitrato de amônio 1,0 g/l, cloreto férrico 0,05 g/l, cloreto de cálcio 0,02 g/l e ágar 20 g/l. Os isolamentos *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus thuringiensis* mostraram o maior índice de emulsificação após 24 horas, 57 % e 35 %, respectivamente.

Barros *et al*., (2008) analisaram o índice de emulsificação utilizando diversos hidrocarbonetos e óleos na presença do biossurfactante produzido por cepas do *Bacillus subtilis* com substrato da manipueira. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que, no período de 24 horas, as camadas obtiveram um índice de 60 % a 80 % de emulsão.

2.2.1.3 Tolerância a diferentes condições de temperatura, pH e força iônica

Os biossurfactantes possuem maior estabilidade e tolerância térmica, força iônica e pH, o que facilita o seu emprego em diversos ambientes e condições extremas (Silva, 2014).

Barros *et al*., (2008) testaram o biossurfactante produzido pela cepa de *Bacillus subtilis*, em diversas situações de temperatura, faixas de pH e concentrações de salinidade. Quando exposto a temperaturas de 20 °C a 100 °C por 2 hora, e diferentes concentrações salinas de 1 mg/ml e 2,5 mg/ml não houveram mudanças significativas na tensão superficial, já quando exposto a diferentes faixas de pH, o biossurfactante se mostrou estável entre o pH 6 e pH 8, próximos à neutralidade.

2.2.1.4 Transporte de hidrocarbonetos e aderência/liberação da célula de superfícies pela excreção de biossurfatantes

Os microrganismos podem utilizar os surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, no qual visa aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade nutricional ou de espaço (Nitschke e Pastore, 2002). É uma estratégia de sobrevivência, que possibilita a colonização e a multiplicação em um nicho ecológico (Nitschke e Pastore, 2004).

2.2.1.5 Atividade antibiótica

A atividade antibiótica ocorre através da excreção dos biossurfactantes no meio, no qual os microrganismos apresentam maior chance de sobrevivência e maior competitividade por nutrientes (Nitschke e Pastore, 2002).

Murugan *et al*., (2016) obtiveram resultados satisfatórios testando o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* pelo método de difusão em agar contra quatro tipos de bactérias patogênicas *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Bacillus cereus e Staphylococcus aureus,* e concluíram que o biossurfactantes produzido possui atividade antibiótica e possui potencial para ser empregado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

2.2.2 Aplicações dos Biossurfactantes

Um dos maiores mercados para os tensoativos sintéticos e biológicos são a indústria petrolífera, no qual são utilizados na recuperação terciária de petróleo ou em outros processos, como, na preparação de fluidos de perfuração e na separação de emulsões água-óleo (Gomes, 2009; Pereira *et al*., 2013). Outras aplicações incluem a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, agricultura, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Atualmente, o uso dos biossurfactantes podem ser ampliados para diversos setores como indústrias de alimentos, fármacos, entre outros. (Nitschke e Pastore, 2002).

2.2.2.1 Biorremediação

As técnicas convencionais para remediação de áreas afetadas por derivados de petróleo apresentam problemas operacionais em razão do seu alto custo, necessidade de pessoal e de equipamentos especializados (Barros, 2010). Diante disso, uma alternativa eficaz é o processo de biorremediação, no qual são utilizados microrganismos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente ou a sua redução a níveis de concentração aceitáveis (Souza *et al*., 2014).

Os biossurfactantes possuem potencial para aumentar a interação superficial água/óleo, possibilitando um aceleramento na degradação de contaminantes em águas e solos. Certos microrganismos, tais como *Pseudomonas oleovorans, P. mendocina, P. aeruginosa, Marinomonas vaga, Escherichia coli, Burkholderia gladioli, B.cepacia, Bacillus subtilis,* apresentam potencial para a biorremediação (Barros, 2010).

Zhang *et al*., (2016) simularam a recuperação de óleo utilizando os biossurfactantes lipopeptídeos produzidos pela espécie *Bacillus*. Os resultados por espectroscopia no infravermelho indicaram uma remoção de cerca de 90,0 % de óleo bruto adsorvido em areia, tornando-os candidatos para aplicação na biorremediação de locais contaminados com óleo.

2.2.2.2 Limpeza de reservatórios de óleo

Os resíduos pesados que se sedimentam no fundo dos tanques são altamente viscosos e na maioria das vezes não são removidos pelo bombeamento convencional. Nestes casos, um processo que se torna viável é a utilização do biossurfactante, que tem a função de diminuir a viscosidade formando emulsões que facilitam o bombeamento dos resíduos (Nitschke e Pastore, 2002).

De acordo com Desai e Banat, (1997) cerca de 90 % do petróleo bruto é recuperado após a utilização do biossurfactante na limpeza dos reservatórios, além do petróleo comercializado, o óleo pode ser recuperado e destinado à venda, viabilizando os custos de produção dos tensoativos e garantindo menores riscos aos trabalhadores, quando comparados aos métodos convencionais aplicados.

2.2.2.3 Fármacos

Entre os biossurfactantes produzidos, os do tipo glicolipídeos e lipopeptídeos são os mais utilizados na indústria farmacêutica (Desai e Banat, 1997).

Os glicolipídeos, em especial os soforolipídeos, apresentam atividade anticancerígena na inibição de tumores, ação desodorante e hidratante. E os ramnolipídeos possuem atividades pesticida, antibacteriana, antifúngica e antiviral e podem servir como fonte do ramnose (Banat *et al*., 2000). Os lipopeptídeos, em especial a surfactina possui atividade bactericida, fungicida, antiviral, agente antitumoral, atua como inibidor da formação de coágulos fibrinosos, antimicoplasmático, veículo para a administração de drogas via pulmonar e é capaz de inibir a formação de biofilmes de outras bactérias, incluindo a patógena *Salmonella* (Banat *et al*., 2000).

E também, a surfactina pode ser usada para fins medicinais em aplicações relacionadas ao aumento da segurança de processos biotecnológicos e farmacêuticos, tais como derivados de sangue e produtos obtidos de culturas de células, os quais possuem risco de transmitir doenças (Barros *et al*., 2007).

2.2.2.4 Cosméticos

A indústria de cosméticos utiliza grandes quantidades de surfactantes numa variedade de produtos, tais como: repelentes de insetos, antiácidos, pomadas para acne, soluções para lentes de contato, tintura para cabelos, desodorantes, esmaltes para unhas, maquiagem, produtos para bebê e hidratantes (Ferreira *et al*., 2017).

Algumas empresas estudam a utilização de surfactantes biológicos na composição de alguns produtos farmacêuticos e de higiene, os quais devem ser empregados após alguns processos de recuperação, concentração e purificação de acordo com as exigências de cada produto. Por exemplo, os soforolipídeos possuem a propriedade de sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para a pele e cabelos (Nitschke e Pastore, 2002). A literatura também descreve o uso dos soforolipídeos na estimulação da síntese de colágeno, utilizado como medida preventiva no envelhecimento da pele (Muthusamy *et al*., 2008).

2.2.2.5 Alimentos

Na indústria de alimentos, os surfactantes são utilizados como emulsificantes na formação da consistência e textura, na solubilização de aromas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados (Pereira *et al*., 2013; Sobrinho *et al*., 2008). Os compostos com a capacidade de formar emulsões têm sido aplicados à solubilização de aditivos alimentares lipofílicos, substituição de solventes em preparações de aromas, estabilidade química de flavorizantes e aumento da eficiência de antimicrobianos (Silva *et al*., 2015).

Os biossurfactantes podem ser aplicados na indústria de alimentos como agentes antiadesivos, ou seja, reduzindo a adesão de microrganismos em superfícies sólidas e prevenindo a formação de biofilmes (Faria, 2010). Outras aplicações envolvem a melhoria da textura dos produtos à base de gordura, a durabilidade dos produtos contendo amido pela formação de complexos, o qual é responsável pela modificação das propriedades da farinha de trigo na interação com o glúten, e promovem a solubilização de aromas (Barros *et al*., 2007). A manoproteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode estabilizar emulsões água/óleo

para produção, por exemplo, de maionese, molhos para salada, biscoitos e sorvetes (Banat *et al*., 2000).

No entanto, os biossurfactantes ainda não são utilizados em larga escala pela indústria de alimentos, devido a necessidade de aprovação de muitas propriedades dos biossurfactantes, assim como a regulação da adição de novos componentes devem ser resolvidas, como questões nutricionais, funcionais, sensoriais, biológicas e toxicológicas do novo ingrediente e questões econômicas (Barros *et al*., 2007). Atualmente, os fosfolipídeos ou lecitinas e alguns ésteres de ácidos graxos possuem aprovação como aditivos ou ingredientes quando utilizados em quantidades limites aceitáveis pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), de acordo com a resolução CNS/MS no 04 de 24 de novembro de 1988.

2.2.2.6 Agricultura

No setor da agricultura, os biossurfactantes são amplamente utilizados por serem eficientes tensoativos. Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp* são aplicados na produção de pesticidas, uma vez que esses produtos possuem a necessidade de adição de agentes emulsificantes em sua formulação (Nitschke e Pastore, 2002). Os biossurfactantes do tipo ramnolipídeos são utilizados no controle biológico de plantas patogênicas (Banat *et al*., 2000). Embora a utilização de biossurfactantes na agricultura seja reduzida, existem possibilidades de identificar novos produtos microbianos para diversas aplicações na agricultura, como compostos antifúngicos, citotóxicos, bactericidas e nematicidas.

A partir das funções fisiológicas presentes nos diversos biossurfactantes produzidos com diferentes microrganismos e meio de cultivo é possível identificar potenciais aplicações industrias, conforme mostrado peela Tabela 1.

Tabela 1- Principais aplicações dos biossurfactantes.

Funções	**Aplicação**
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Agricultura e produtos de limpeza
Agentes espumantes	Produtos de higiene e cosméticos
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcário-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

Fonte: Banat et al., (2000).

2.2.3 Classificação dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros, além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Barros *et al*., 2007). Cada classe de biossurfactante está relacionado com o tipo de microrganismo envolvido no processo de fermentação e consequentemente com a composição da molécula, conforme Tabela 2.

Tabela 2- Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos na sua produção.

Tipos de Biossurfactantes	Microrganismos
Glicolipídeos	
- rhamnolipídeos	*Pseudomonas aeruginosa*
- soforolipídeos	*Torulopsis bombicola, T. apícola, T. candida*
- trehalolipídeos	*Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium* sp.
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- peptídeo-lipídeo	*Bacillus licheniformis*
- viscosina	*Pseudomonas fluorescens*
- serrawetina	*Serratia marcescens*
- surfactina	*Bacillus subtilis*
- subtilisina	*Bacillus subtilis*
- gramicidina	*Bacillus brevis*
- polimixina	*Bacillus polymyxa*
Fosfolipídeos, Ácidos graxos e lipídeos neutros	
- ácidos graxos	*Corynebacterium lepus*
- lipídeos neutros	*Nocardia erythropolis*
- fosfolipídeos	*Thiobacillus thiooxidans*
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
- biodispersan	*Acinetobacter calcoaceticus*
- liposan	*Candida lipolytica*
- carboidrato-lipideo-proteína	*Pseudomonas fluorescens* *Candida tropicalis*
- manana-lipídeo-proteína	
Surfactantes particulados	
- vesículas	*Acinetobacter calcoaceticus*
- células	Várias bactérias

Fonte: Nitschke; Pastore (2002).

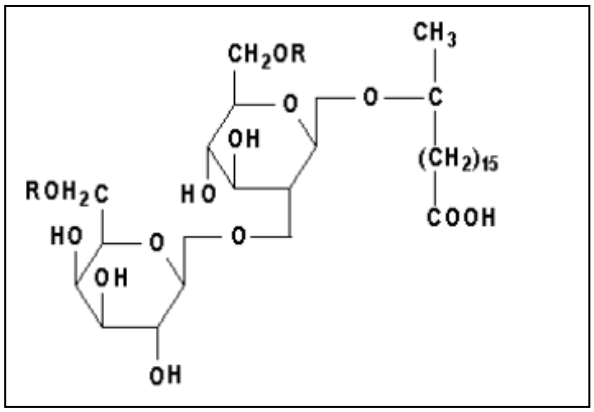
2.2.3.1 Glicolipídeos

Glicolipídeos são geralmente ácidos graxos hidroxilados ligados a um carboidrato via ligação glicosídica. Entre os glicolipídeos mais conhecidos, estão respectivamente, soforolipídeos e ramnolipídeos que são produzidos por *Torulopsis Candida* e *Pseudomonas,* respectivamente (Desai e Banat, 1997).

Os biossurfactantes glicolipídeos são tolerantes a condições extremas de pH, temperatura e força iônica e podem ser produzidos utilizando diversos substratos, incluindo os alcanos, óleos vegetais e fontes de carboidratos como a glicose (Desai e Banat, 1997).

Os soforolipídeos são formados por molécula de soforose ligado a uma cadeia de ácido graxo hidroxilado (Figura 1) no qual oferecem vantagens significativas em relação aos detergentes tradicionais produzidos quimicamente, pois são biodegradáveis, não tóxicos ao meio aquático e com potencial para uso em formulações de lavagem e de limpeza (Bueno, 2008).

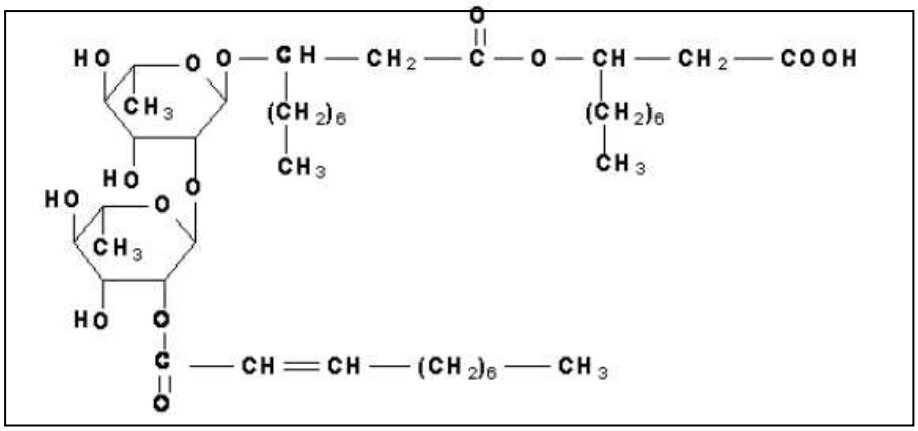
Figura 1- Estrutura do soforolipídeo produzido por *Candida bombicola***.**



Fonte: Desai e Banat (1997).

Os ramnolipídeos (Figura 2) são biossurfactantes pertencentes a classe dos glicolipídeos mais estudados, estes compostos formados por moléculas de ramnose ligadas a moléculas de ácido hidroxidecanóico possuem potencial para reduzir a tensão superficial, estabilizar emulsões, promover a formação de espumas, geralmente não são tóxicos e possuem atividade antifúngica (Bueno, 2008).

Figura 2- Estrutura do ramnolipídeo produzido por *Pseudoma aeruginosa.*



Fonte: Desai e Banat (1997).

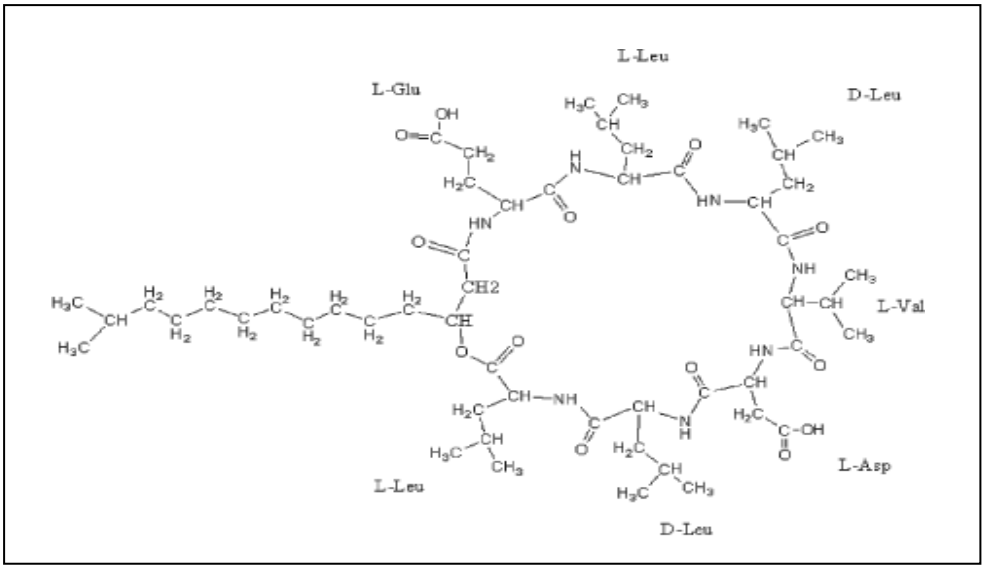
2.2.3.2 Lipopeptídeos e lipoproteínas

Entre os lipopeptídeos e lipoproteínas, são obtidas a surfactina, viscosina, polimixina, octapeptinas, fengicinas e iturinas, as quais possuem efeitos antitumorais, antibióticos imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas (Bueno, 2008; Zhang *et al*., 2016).

A surfactina natural é uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia formada por hidroxi ácido graxo e a substituições dos aminoácidos componentes do anel. Estas variações dependem mais da linhagem e das condições nutricionais e ambientais, do que de determinação genética (Bezerra, 2012; Barros *et al*., 2007; Nitschke e Pastore, 2002). Os fatores de crescimento para os microrganismos geralmente não são conhecidos e por isso microbiologistas adicionam compostos complexos como extrato de levedura e peptona para garantir tais suprimentos (Andrade, 2011).

Devido a estrutura da surfactina ser formada por uma porção polar composta por um peptídeo cíclico de sete aminoácidos, com sequência Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu, ligada a uma cadeia apolar de ácidos graxos, 3 hidroxi-13-metil-tetradecanóico, este composto apresenta características anfipáticas e consequentemente se destaca por possuir diversas atividades biológicas como antibióticas, antivirais e excepcional atividade superficial (Banat *et al*., 2010; Barros *et al*., 2007).

Figura 3- Estrutura da surfactina produzida por *Bacillus subtilis.*



Fonte: Barros et al., 2007.

O gênero *Bacillus subtilis* destaca-se por possuir capacidade natural para secretar antibióticos e biossurfactantes, que são compostos de alto valor biotecnológico (Zhang *et al*., 2016).

Barros *et al*., (2008) produziram biossurfactante utilizando a linhagem LB5a de *Bacillus subtilis*, cultivado em manipueira. O biossurfactante exibiu uma excelente atividade tensoativa quando exposto a diferentes condições de temperatura, pH e força iônica e obtiveram elevados índices de emulsão durante o período de 24 horas para diversos hidrocarbonetos cíclicos e alifáticos, além de óleos vegetais. Os resultados satisfatórios demonstraram a importância do biossurfactante para potenciais aplicações em diversos ramos industriais.

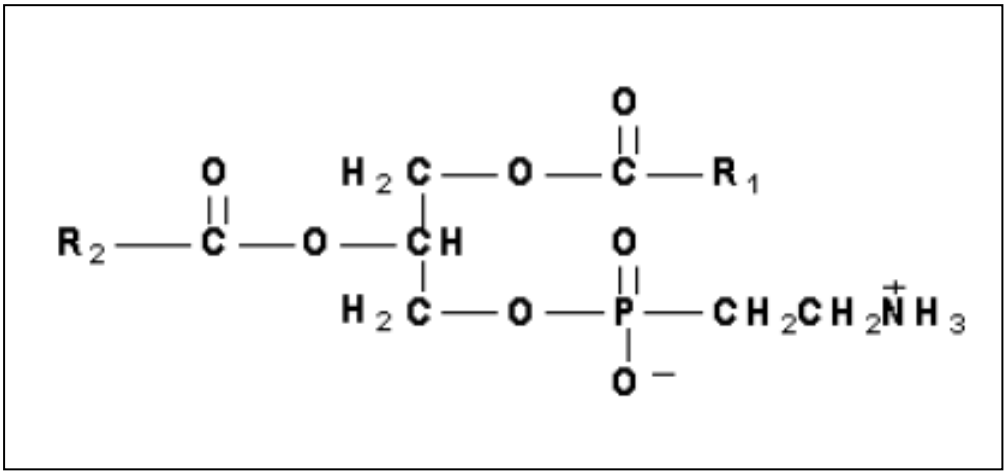
Murugan *et al*., (2016) selecionaram algumas cepas identificadas como *Bacillus subtilis*, as amostras obtiveram características morfológicas e bioquímicas positivas para a produção de biossurfactantes, utilizando como substrato a gasolina. O *Bacillus subtilis* se mostrou apresentar atividade tensoativa numa vasta faixa de pH e temperatura, a análise qualitativa do biossurfactante foi realizada por testes de saponificação e cromatografia, no qual foi confirmado a presença de substâncias lipídicas, e a produção do biossurfactante, respectivamente.

2.2.3.3 Fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros

Várias bactérias e leveduras são responsáveis por produzirem grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídeos, durante o crescimento em alcanos. Estes compostos são formados pela molécula de glicerol ligada a moléculas de ácidos graxos ou por fosfatos (Desai e Banat, 1997).

A produção dos fosfolipídios têm sido detectada em alguns *Aspergillus spp.* e *Thiobacillus Thiooxidans* (Desai e Banat, 1997). Um dos microrganismos que também produzem esse tipo de biossurfactante são as *Acinetobacter sp*, na qual possuem características de formar emulsões óleo/água e reduzir a tensão superficial (Banat *et al*., 2010). A Figura 4 apresenta a estrutura química da fosfatidiletanolamina composta pelo glicerol, porção apolar, ligado ao fosfodiéster, responsável pelas características polares da molécula.

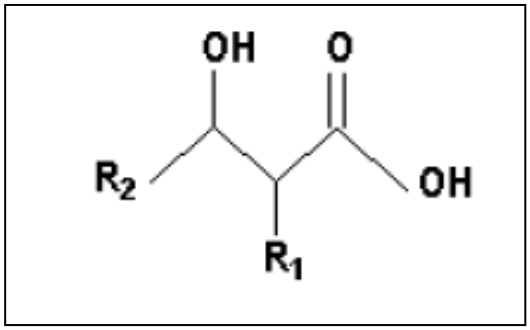
Figura 4- Estrutura da fosfatidiletanolamina produzido por *Acinetobacter sp.*



Fonte: Desai e Banat (1997).

Os lipídeos neutros e ácidos graxos possuem a propriedade tensoativa e são sintetizados por alguns microrganismos, entre eles, *Nocardia, Corynebacterium* e *Rhodococcus* (Banat *et al*., 2010). A Figura 5 mostra a estrutura do ácido graxo produzido pelo microrganismo *Corynebacterium sp.*

Figura 5- Estrutura do ácido graxo produzido por *Corynebacterium sp*.

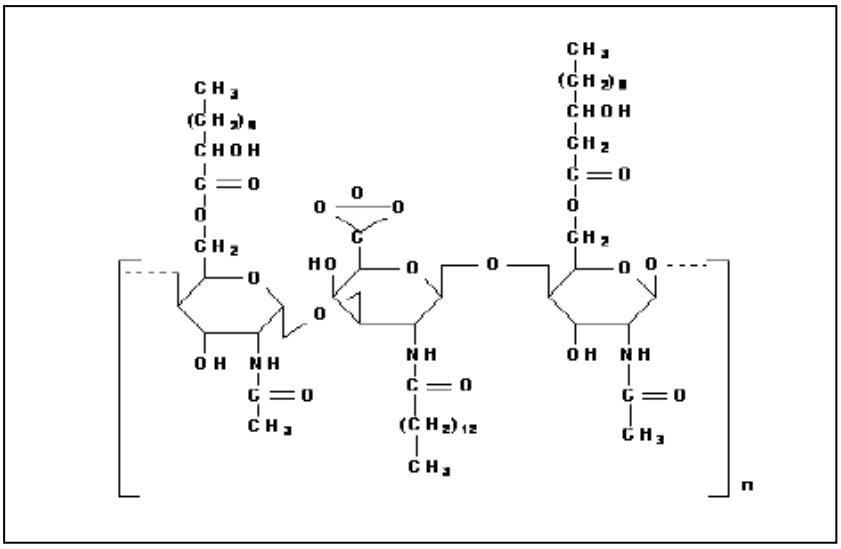


Fonte: Desai e Banat (1997).

2.2.3.4 Poliméricos e particulados

Os biossurfactantes poliméricos e particulados são ácidos graxos ligados a polissacarídeos de alto peso molecular, podem ser divididos em emulsan, liposan, biodispersan e manoproteína. Entretanto, o emulsan produzido por *A. colcoaceticus*, ilustrado na figura 6, se destaca por ser um agente emulsionante muito eficaz podendo remover resíduos oleosos em 70% (Desai e Banat, 1997).

Figura 6- Estrutura do emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*.



Fonte: Desai e Banat (1997).

2.3 Produção de Biossurfactantes

A produção dos biossurfactantes ainda é limitada devido ao alto custo de produção, para torná-lo competitivo aos surfactantes sintéticos, algumas estratégias devem ser utilizadas (Bezerra, 2012):

- Uso de substratos mais baratos para reduzir os custos iniciais do processo;
- Desenvolvimento de processos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultivo e o custo de recuperação e separação do biossurfactante;
- O uso de cepas recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante.

No contexto, alguns estudos básicos do processo fermentativo que incluem o microrganismo, o meio de cultura e as condições do processo são fundamentais para garantir e aprimorar a produção do biossurfactante (Nitschke e Pastore, 2006). Neste trabalho foi evidenciado a produção de biossurfactante utilizando substratos obtidos através de resíduos da laranja.

2.3.1 Microrganismos

Os biossurfactantes podem ser sintetizados por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Os microrganismos escolhidos devem ser eficientes quanto a conversão do substrato em produto e permitirem o acúmulo do produto no meio, para obter elevada concentração do metabólito no caldo fermentado (Bezerra, 2012).

Os microrganismos procariontes ou eucariontes possuem diversas estruturas químicas que podem ter baixo ou alto peso molecular, podendo interferer na ação e característica do biossurfactante. Por exemplo, os biossurfactantes de alto peso molecular, como os ácidos graxos estão associados à produção de emulsão e requerem meios de cultura específicos, enquanto que os biossurfactantes de baixo peso molecular, como os glicolipídeos, possuem maior atividade tensoativa (Bueno, 2008; Ron e Rosenberg, 2002).

2.3.2 Meios de Cultura

A função biológica dos surfactantes microbianos está associada ao acesso aos substratos, aumentando a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos produtores.

A fim de reduzir os custos de produção para ampliação das possibilidades de aplicação, o uso de resíduos industriais ou orgânicos como meio de cultivo é uma alternativa viável, uma vez que a matéria-prima representa cerca de 30% de custos totais em um processo biotecnológico (Barros *et al*., 2007).

Os melhores substratos para o crescimento microbiano são os resíduos ricos em carboidratos ou lipídeos, com adequada relação carbono/nitrogênio e que apresentem altas concentrações de micronutrientes importantes para o metabolismo microbiano (Pereira *et al*., 2013). A maior dificuldade encontrada em utilizar resíduos industriais ou orgânicos é obter resíduos com quantidades suficientes de nutrientes que garantam o crescimento e o metabolismo microbiano, geralmente para padronizar e suprir alguma deficiência nutricional do meio, utiliza-se a suplementação com meios minerais, como, nitrogênio, fosfatos, íons metálicos e outros componentes (Nitschke e Pastore, 2002).

Muitos estudos são voltados para a otimização das condições de cultivo, como a proporção e tempo de incubação do inóculo, temperatura, agitação ou a combinação desses fatores (Bezerra, 2012; Pereira *et al*., 2013; Soares, 2014).

Pereira *et al*., (2013) utilizou diferentes fontes de carbono e nitrogênio como meio de cultivo para a produção de biossurfactantes a partir de três variações do *Bacillus subtilis.* Entre as fontes de carbono avaliadas, acetato de sódio, citrato de sódio, frutose, glicose, glicerol, n-hexadecano, lactose, extrato de carne, parafina, sacarose, triptona e extrato de leveduras, a sacarose e a glicose obtiveram os menores valores de tensão superficial para os três isolados, cerca de 28mN/m e índice de emulsão aproximado de 39%, comprovando a eficiência da utilização de fontes de carbono como substrato no bioprocesso.

Soares (2014) estudou produção de biossurfactante a partir do *Bacillus subtilis* utilizando suco de caju clarificado como fonte de nutriente. Os resultados mostraram que o biossurfactante produzido reduziu a tensão da água para 28,20mN/m, apresentou índice de emulsão superior a 50 % e concentração micelar crítica de 17,3 mg/L.

Outros resíduos também já foram testados como substrato, dentre eles estão o melaço, soro de leite, rejeitos do processamento de óleos, resíduos do processamento de soja e diversas frutas (Nitschke e Pastore, 2002; Bezerra, 2012; Soares 2014; Ehrhardt 2015; Zhang *et al*., 2016).

2.4 Resíduos da Laranja

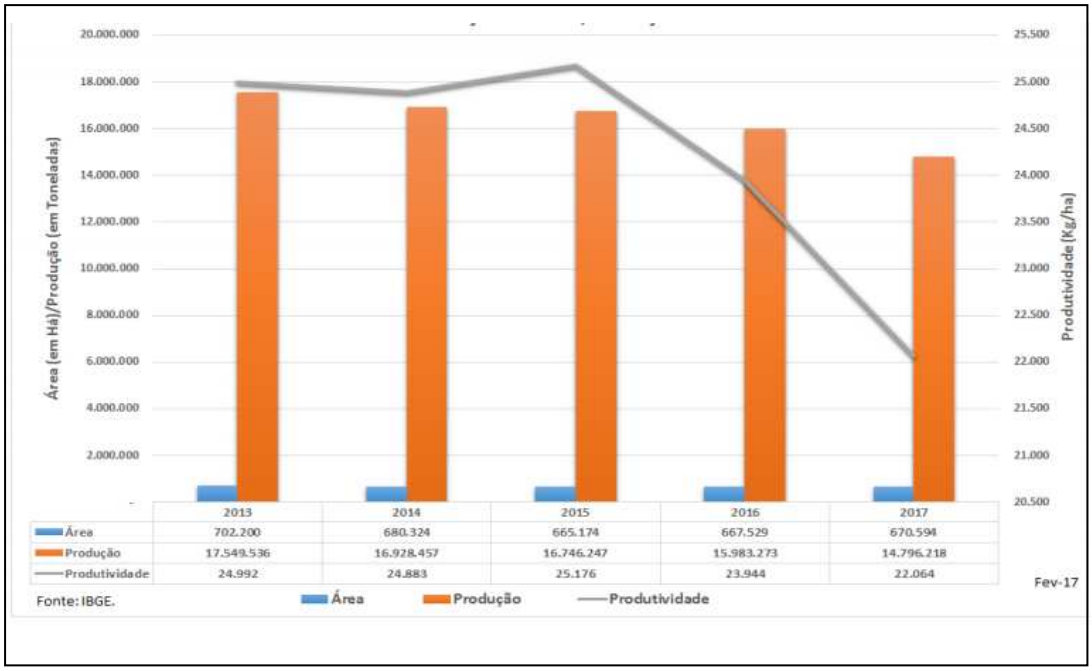
Conhecida cientificamente por *Citrus sinensis*, a laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, as principais variedades são pera, natal, valência e lima.

A produção mundial de laranja ultrapassa 50 milhões de toneladas/ano, sendo o Brasil responsável por cerca de 25% da produção (Conab, 2017).

No Brasil, a laranja é uma das principais frutas produzidas, correspondendo cerca de 40,9 % do volume total de frutas produzidas, sendo cultivada em diversos estados, com uma área de mais de 800 mil hectares. (Seab, 2017). Nos últimos anos, mais da metade da produção de sucos de frutas no mundo são produzidas no Brasil (Santos, 2015).

O IBGE, no relatório divulgado no mês março de 2017, estimou para a safra de laranja *in natura*, uma produção brasileira superior a 14 milhões de toneladas; quantidade inferior quando comparado com a safra passada (Figura 7).

Figura 7- Produção e produtividade da laranja no Brasil.



Fonte: Conab (2017).

A produção mundial de suco de laranja na safra 2016/17, em comparação à safra anterior, cresceu cerca de 21,70 %, no qual o Brasil, conforme relatório do Conab, responsável pelo maior incremento, 44,10 %, e produção de 1.222 mil toneladas, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8- Produção mundial de suco de laranja (.1000 T).

Países/ Safras	Mundo	Brasil	Estados Unidos	México	Europa	China	África do Sul	Austrália	Outros
2012/2013	1.934	980	607	151	83	45	39	9	21
2013/2014	2.084	1.230	476	126	114	55	48	10	25
2014/2015	1.831	1.006	438	159	97	50	41	10	30
2015/2016	1.617	848	383	165	100	46	45	8	23
2016/2017	1.968	1.222	355	170	101	42	44	8	25
Var.15/16-16/17	**21,70**	**44,10**	**-7,31**	**3,03**	**1,71**	**-8,70**	**-0,24**	**0,00**	**10,03**

Fonte: Conab (2017).

Em média 34% da produção de laranja é transformada em suco, mas em grandes países produtores como o Brasil e Estados Unidos, esta percentagem chega a 96%, o que gera grande quantidade de resíduos. Este material, composto pelo bagaço, casca, polpa, sementes e

resíduos líquidos equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82% (Alexandrino *et al.,* 2007).

Os resíduos sólidos são ricos em óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais. Em especial, a casca da laranja é constituída de 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina, apresentando alto potencial de conversão biológica (Santos, 2015).

Vários estudos propõem usos para esses resíduos da laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, óleos essenciais, compostos com atividade antioxidante e enzimáticos, no caso, a casca da laranja por possuir essência oleosa, pode ainda ser utilizada na preparação de geleias e licores (Tessaro *et al*., 2010; Santos, 2015; Ahmed *et al*.., 2016).

Alexandrino *et al*., (2007) utilizaram o resíduo de laranja como substrato para o cultivo de *Pleurotus. Ostreatus*. Neste estudo, o resíduo de laranja proporcionou as condições nutricionais necessárias para o crescimento do microrganismo após 15 dias de cultivo, não necessitando suplementação de fonte de carbono ou nitrogênio.

Tessaro *et al*., (2010) estudaram a fabricação de vinagre a partir da fermentação da *Saccharomyces cerevisiae* utilizando como substrato a laranja pera com diferentes correções de açucares do suco obtido. Os resultados mostraram que a laranja, pode ser empregada nos processos fermentativos, sendo que o suco com correção do Brix de 22% apresentou as melhores condições fermentativas.

Santos *et al*., (2010) usaram óleo de fritura, glicerina e bagaço de laranja na produção de biossurfactante através da fermentação pela cepa LB09 isolada de borra de petróleo. Os autores obtiveram uma redução da tensão superficial da água de até 27,49 mN/m, além de apresentar um índice de emulsificação acima de 40 % em hexano e tolueno. O biossurfactante produzido foi aplicado em teste de biorremediação, simulando contaminação do solo por petróleo, após a lavagem desse biossurfactante, o resíduo oleoso conseguiu ser parcialmente removido da areia.

Portanto, a preocupação ambiental e os avanços biotecnológicos nos últimos anos, gerou um aumento na procura por surfactantes naturais, e por consequência a utilização de novos substratos ricos em carboidratos que apresentem altas concentrações de nutrientes ou misturas dos mesmos com o menor custo, vem se tornando uma alternativa viável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os biossurfactantes foram produzidos a partir das cepas de *Bacillus subtilis* provenientes do núcleo de cultura do CPQBA- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.

Os equipamentos utilizados ao longo do trabalho são descritos na Tabela 3, com respectivos modelos e marcas.

Tabela 3- Equipamentos utilizados.

Equipamentos	Modelo	Marca
Agitador vortéx	IA-MS 3	IKA
Alça de platina	-	-
Autoclave	127 V	STERMAX
Centrífuga	14 R	Velocity 14
Espectrofotômetro	AJX- 1900	Micronal
Estufa	-	FANEM
Pipeta automática	basic	KASVI
Shaker	DubNoff	Marconi
Balança analítica	AUY220	Shimadzu
Bico de bunsen	-	-
Incubadora	-	-
pHmetro	-	Lutron

Os reagents com suas procedências e descrições de uso são descritas na Tabela 4.

Tabela 4- Reagentes utilizados.

Reagentes	Marca	Uso
Cloreto de Sódio P.A.	Synth	Pré-inóculo/ Teste de estabilidade frente à força iônica
Glicose Anidra	Synth	Pré-inóculo
Peptona	KASVI	Pré-inóculo
Óleo de soja	Liza	Índice de emulsão
Querosene	Natrielli Química	Índice de emulsão
Óleo de motor	Novoil	Teste de biorremediação
Areia fina- seca	-	Teste de biorremediação

3.2 Métodos

3.2.1 Microrganismo

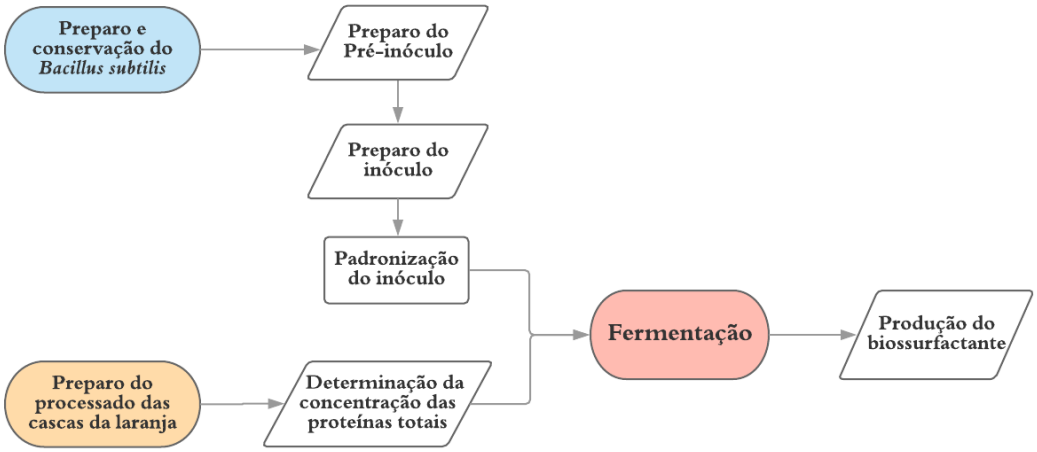
As cepas do *Bacillus subtilis* foram preservadas por repiques utilizando ágar nutriente, autoclavadas à temperatura de 37° C por 15 minutos e deixadas em repouso até atingir a tempereatura ambiente (Andrade, 2011).

Para o repique foram utilizados a alça de platina e bico de bunsen. Os tubos repicados ficaram incubados na incubadora por 30 ± 2 °C por 24 horas e mantidos refrigerados a 4° C, para que houvesse a conservação dos microrganismos (Sen e Swaminathan, 2005).

3.2.2 Produção de Biossurfactante

As etapas do processo para a obtenção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando o processado das cascas da laranja são apresentadas a partir do fluxograma simplificado, conforme mostrado na Figura 9.

Figura 9- Fluxograma da produção de biossurfactante.



O processo de produção do biossurfactante foi realizado com auxílio de um shaker, de agitação pré-fixada, a temperatura constante de 37°C. A temperatura utilizada foi baseada em estudos que determinam a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* no intervalo de 25° C a 38° C (Andrade, 2011; Sen e Swaminathan, 2005; Barros *et al*., 2008), sendo 37,4° C a temperatura ideal para o processo (Sen e Swaminathan, 2005).

3.2.2.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado a metodologia de Ehrhardt (2015).

A metodologia se baseia em inicialmente preparar as soluções de pré-inóculo e do inóculo contendo as concentrações (m/v) de peptona, 0,76 %, cloreto de sódio, 0,06 % para todas as fermentações.

O pré-inóculo foi preparado com uma solução aquosa de 15 mL contendo peptona, cloreto de sódio e glicose, em seguida, esta foi autoclavada e resfriada para o meio de cultura ser inoculado. Para o processo do preparo do inóculo foi utilizado o bico de bunsen e alça de platina.

A segunda solução utilizada para o inóculo foi preparada com uma solução aquosa de 100 mL peptona, cloreto de sódio e glicose, e autoclavada.

Em seguida as soluções preparadas foram colocadas em um agitador rotatório (Shaker) durante 6 horas em uma temperatura de 37° C. Após este período, uma porção de 10 mL da solução do pré-inóculo, foi transferida para a solução do inóculo. Esta solução foi mantida no agitador rotatório (Shaker) por 14 horas na temperatura de 37° C.

Posteriormente foi realizada a padronização do inóculo utilizando 100 mL do mesmo meio nutriente ajustado medindo em espectrofotômetro para uma faixa de absorbância de 0,08 a 0,1, em comprimento de onda de 660 nm, de acordo com a metodologia utilizada.

3.2.2.2 Preparo do Meio de Cultura

As cascas de laranja Pera foram processadas no liquidificador e o caldo foi centrigufado à 4226 rpm por 25 minutos e autoclavado a 120° C, durante 15 minutos. Em seguida, 80 mL do sobrenadante do caldo das cascas da laranja foram armazenados em cada um dos seis frascos utilizados.

As cascas de laranja Pera, *Citrus sinensis (L.) Osbeck*, foram cedidas pela Padaria Amizade de Americana- SP.

3.2.2.2.1 Determinação da concentração de Proteínas Totais

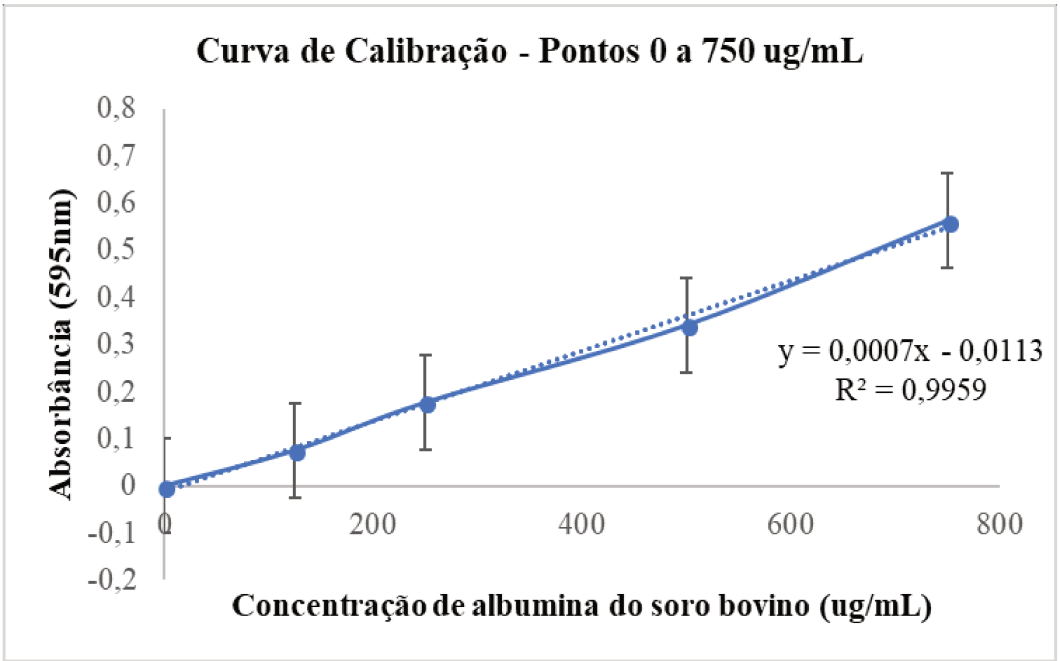
A dosagem de proteínas totais foi obtida a partir da utilização do Método descrito por Bradford (1976), caracterizado por uma curva padrão com diferentes concentrações de albumina do soro bovino (BSA) em presença de uma solução contendo corante.

A curva de calibração foi construída a partir do preparo de uma solução de BSA de 2 mg/ mL. Os pontos foram construidos utilizando 0,002 g de BSA e 1 mL de água destilada. O BSA foi diluído em amostras triplicadas contendo 0; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL. Em seguida foram adicionados 1 mL do reagente de Bradford em cada amostra e agitados, após serem incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente; foi realizada a leitura da absorbância.

Para comprovar que o processado das cascas da laranja era protéico, foram preparadas amostras contendo 20 μL, após serem incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, tendo como zero o corante.

A Figura 10 representa a curva de calibração obtida com concentrações conhecidas de BSA para a determinação de proteínas totais.

Figura 10- Curva de Calibração de BSA.



3.2.2.3 Fermentação

O processo de fermentação foi baseado nas metodologias de Ehrhardt (2015) e Sen e Swaminathan, (2005).

Foram adicionados aos seis Erlenmeyers contendo o substrato, mencionados anteriormente, 8 mL do inóculo (10 %) e colocados em um agitador rotatório (Shaker) à temperatura de 37° C por 24 horas. Para evitar contaminações, os frascos foram vedados utilizando gaze e algodão.

Durante o período das 24 horas, foram retiradas 7 amostras em diferentes tempos, uma no tempo zero, uma segunda após 1 hora de fermentação, as 4 seguintes em intervalos de 2 horas e a última amostra após 24 horas de fermentação. A amostra no ponto zero de fermentação foi utilizada como controle.

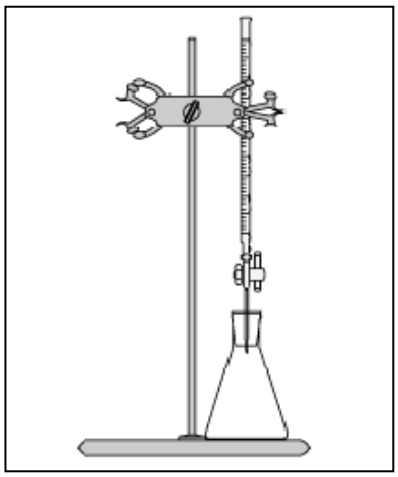
Conforme as amostras foram retiradas eram centrifugadas à 3.000 rpm por 10 minutos e submetidas aos testes de medida da tensão superficial e ao índice de emulsificação.

3.2.3 Medida da Tensão Superficial

A tensão superficial foi medida pelo método do peso da gota baseado em Behring, (2004), o qual mostra resultados eficientes, com erros relativos menores que 5 %.

Este método do peso da gota se baseia em fixar uma buret ao suporte universal e acoplar a um Erlenmeyer, de forma que a parte inferior à torneira fique toda dentro do recipiente coletor, evitando a influência de correntes de ar sobre a formação da gota, conforme mostrado pela Figura 11.

Figura 11- Sistema utilizado para a medida da tensão superficial.



Fonte: Behring (2004).

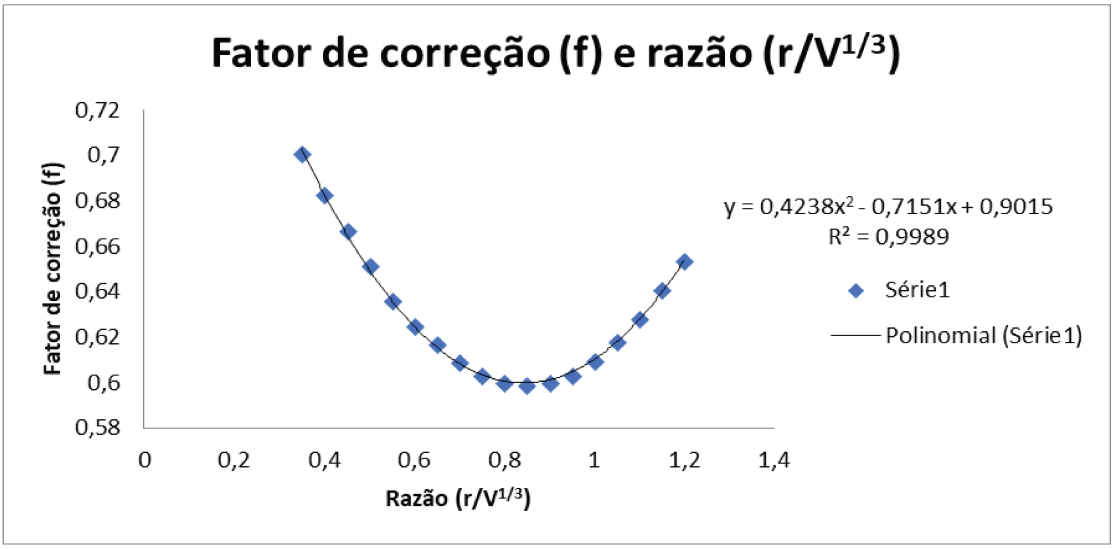
Foi ajustado a queda das gotas em intervalos de 1 minuto para determinar a massa e o raio da circunferência da gota e posteriormente calcular a tensão superficial de acordo com a Equação 1.

$$\lambda = \frac{m \times g}{2 \times \pi \times r \times f} \tag{1}$$

Onde:
- λ - Tensão superficial (mN/m)
- m - Massa da gota (kg)
- g - Aceleração da gravidade (m/s^2)
- r - Raio da gota formada (m)
- f - Fator de correção -

O fator de correção *(f)* é obtido graficamente a paritr da correlação entre o raio e o volume da água, conforme mostrado na Figura 11.

Figura 12- Dependência entre o fator de correção (f) e a razão ($r/V^{1/3}$).



Desta forma, foi possível comparar a tensão das amostras contendo o biossurfactante com a da água igual a 72 mN/m a 25ºC. As medidas foram realizadas em duplicata.

3.2.4 Índice de Emulsão (E_{24})

O índice de emulsão foi medido de acordo com a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg, (1987).

Para este teste, foram utilizados óleo de soja e querosene para verificar a ação do biossurfactante e a sua efetividade no tratamento de solos contaminados, quando exposto a compostos com diferentes viscosidades.

Foram preparadas amostras de 1mL do biossurfactante produzido com 1mL de cada óleo utilizado, em seguida foram misturadas em vortex por um minuto, e deixados em repouso por 24 horas. As análises foram realizadas em duplicatas em todos os tempos de fermentação testados. Após as 24 horas foram realizadas as medidas da altura da emulsão e da altura total, e o índice de emulsão foi calculdo conforme Equação 2.

$$\%(E24) = \frac{Altura\ da\ emulsão}{Altura\ total} \times 100 \quad (2)$$

3.2.5 Testes de Estabilidade

Os testes de estabilidade foram realizados baseados na metodologia proposta por Barros, (2008) e Nitschke e Pastore, (2005), avaliando-se a estabilidade térmica, efeito de pH e força iônica.

Nos testes de estabilidade, o biossurfactante utilizado foi produzido após 24 horas de fermentação à temperatura de 27° C, frente a exposição de altas temperaturas (100 °C e 121 °C), variação de pH (4 a 8) e diferentes concentrações de soluções de NaCl (2,5 a 20 %), para posteriormente ser realizada a medida da tensão superficial, utilizando a metodologia do peso da gota, conforme descrita no ítem 3.2.3.

3.2.5.1 Estabilidade Térmica

Para avaliar o efeito da temperatura na ação tensoativa, uma solução aquosa de 10 mL do biossurfactante produzida foi colocada em tubos de ensaio, e submetidas a 100 °C por períodos de 20, 40, 60, 100 e 140 minutos e a 121 °C por períodos de 20, 40, 60 e 100 minutos em estufa. Após tratamento térmico, cada amostra foi resfriada até temperatura ambiente para medição da tensão superficial.

3.2.5.2 Estabilidade frente ao pH

Para o estudo do efeito do pH na atividade tensoativa, variou-se o pH da solução tampão fosfato entre 4 e 8 nas proporções de 1:1 e 1:2 (solução tampão: solução biossurfactante), em seguida as amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto e, o efeito do pH foi avaliado através da medida da tensão superficial de cada amostra.

3.2.5.3 Estabilidade frente à força iônica

Para o teste do efeito da força iônica, o biossurfactante produzido foi diluído em diferentes concentrações de soluções de NaCl (de 2,5 a 20%), nas proporções de 1:1 e 1:2 (solução salina: solução do biossurfactantes), em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto para posterioremente realizar a medida da tensão superficial.

3.2.6 Remoção de Óleo em Solo Contaminado

O teor de óleo removido do solo durante o processo de biorremediação foi quantificado pelo método gravimétrico, adapatado da metodologia de Luna e Sarubbo, (2009).

Três amostras com 20 g de areia foram contaminadas com 5 mL de óleo de motor e tratadas com 60 mL de biossurfactante (Figura 12). Uma amostra contendo 20 g e 5 mL de óleo de motor foi tratada com 60 mL de água destilada como controle.

Figura 13- Amostras contaminadas tratadas com biossurfactante e água destilada.

Em seguida, as amostras foram incubadas em um Shaker a 110 rpm por 24 horas à 24ºC (Figura 13), posteriormente centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos.

Figura 14- Amostra incubada durante 24 horas.

A porcentagem de remoção de óleo residual da areia após o tratamento com o biossurfactante produzido foi determinada por gravimetria.

As amostras das soluções removidas da areia foram analisadas através da medida da tensão superficial utilizando o método do peso da gota.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Tensão Superficial

A tensão superficial é um dos parâmetros mais utilizados para a determinação da produção de biossurfactantes. No presente trabalho, a redução da tensão superficial foi determinada a partir da técnica do peso da gota, durante o período de 24 horas de cada fermentação, a temperatura de 37° C.

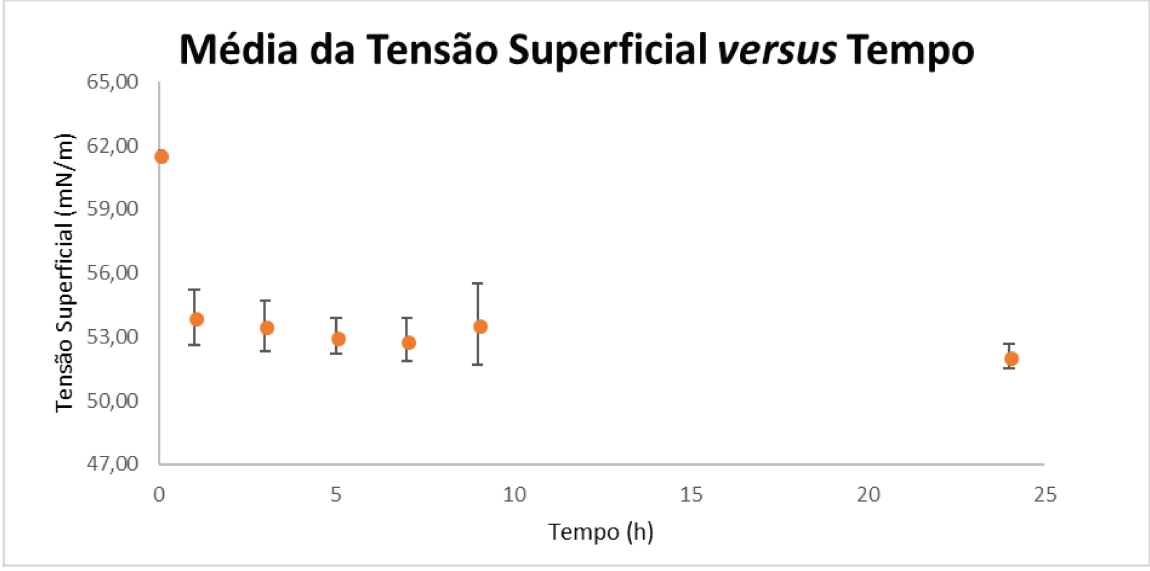
O substrato utilizado oriundo do processamento das cascas da laranja, gerou uma amostra pastosa, a qual para ser utilizada como meio de cultivo no processo fermentativo, foi diluído em diferentes concentrações. Após estudos prelimirares, as fermentações foram realizadas com substratos diluídos em 40 % e 60 %.

As fermentações realizadas em duplicata com o substrato das cascas da laranja diluído em 60%, obteve uma redução da tensão superficial média de 15,4 % após 24 horas, conforme apresentado na Tabela 5 e Figura 14.

Tabela 5- Valores de tensão superficial ao longo do tempo com o substrato diluído em 60%.

Amostras	Tempo	Tensão Superficial (mN/m) Fermentação 1	Tensão Superficial (mN/m) Fermentação 2	Tensão Superficial (mN/m) Média	Desvio Padrão
Inicial	0	61,44	61,73	61,59	0,20
1	1	54,83	53,01	53,92	1,28
2	3	54,36	52,67	53,51	1,19
3	5	53,63	52,45	53,04	0,83
4	7	53,57	52,14	52,85	1,01
5	9	54,95	52,22	53,59	1,93
6	24	52,50	51,67	52,08	0,58

Figura 15- Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato diluído em 60%.



Conforme os dados obtidos experimentalmente, ocorreu uma alta redução da tensão superficial ao longo da primeira hora de fermentação, a qual pode ser devido ao consumo imediato do substrato, diluído em 60 % de água, pelo microrganismo ocasionando uma estabilidade na redução da tensão superficial ao longo das 24 horas de fermentação.

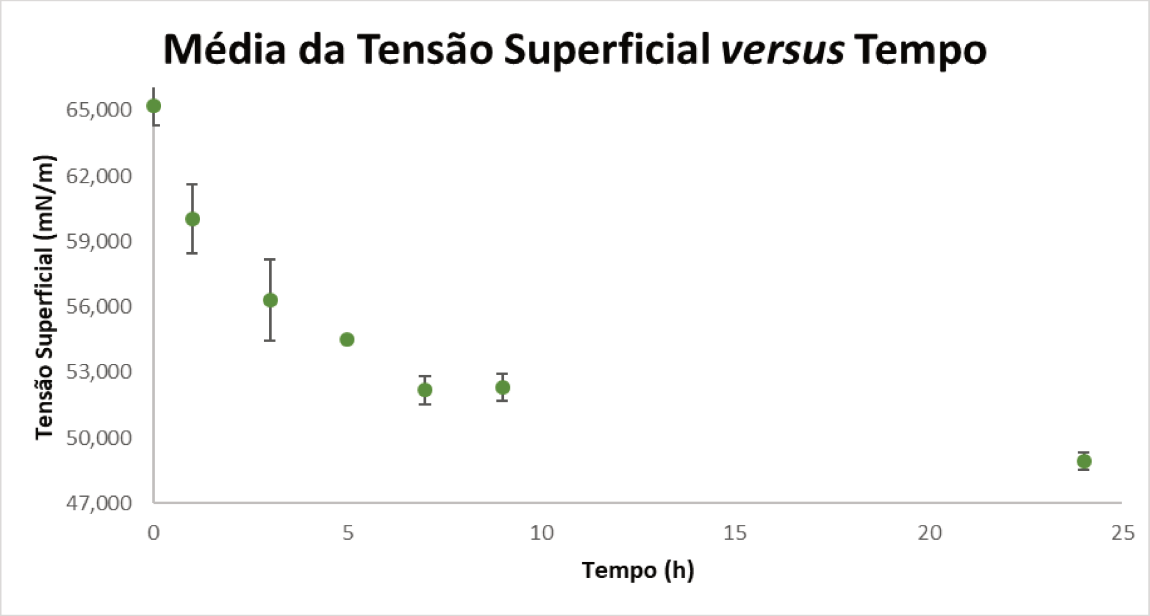
Apesar da alteração cinética do processo fermentativo, o processado das cascas da laranja apresentou potencial utilização como fonte de nutrientes para o meio de cultura. Rane *et al.*, (2017) investigaram o potencial do *Bacillus subtilis* em crescer com diferentes fontes de carbono e cascas de frutas. O isolado produziu em meio contendo extrato da banana e resíduos da casca da laranja, cerca de 0,049 g/l e 0,089 g/l, respectivamente de biossurfactantes, comprovando o crescimento microbiano nos substratos testados.

A Tabela 6 e a Figura 15 apresentam os valores da tensão superficial ao longo das 24 horas utilizando substrato diluído em 40%, no qual as medições do peso das gotas necessárias para a aplicação da metodologia de Behring, (2004) e o processo fermentativo foram realizados em duplicata, para minimizar possíveis erros relativos.

Tabela 6- Valores de tensão superficial ao longo do tempo com o substrato diluído em 40%.

Amostras	Tempo	Tensão Superficial (mN/m) Fermentação 1	Tensão Superficial (mN/m) Fermentação 2	Tensão Superficial (mN/m) Média	Desvio Padrão
Inicial	0	64,57	65,83	65,20	0,89
1	1	58,90	61,13	60,01	1,57
2	3	55,00	57,62	56,31	1,86
3	5	54,60	54,46	54.53	0,10
4	7	51,72	52,64	52,18	0,65
5	9	51,87	52,75	52,31	0,62
6	24	48,66	49,23	48,95	0,40

Figura 16- Análise da média da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato diluído em 40%.



A média da tensão superficial obtida nas fermentações realizadas com o substrato diluído em 40%, variaram ao longo das 24 horas de 65,20 mN/m para 48,95 mN/m após 24 horas de fermentação, obtendo uma redução de 25 % na tensão superficial, o qual indica um resultado favorável para a produção do biossurfactante, de modo que alguns estudos apontam que para considerar um biossurfactante ativo, a redução da tensão superficial deve ser superior a 20% (Ehrhardt, 2015; Rane *et al*., 2017).

A maior redução da tensão superficial foi obtida utilizando o substrato diluído em 40%, o aumento da concentração do processado de laranja ocasionou um consumo gradual do

substrato ao longo das 24 horas de fermentação, o que favoreceu o crescimento microbiano e a redução da tensão superficial ao longo do tempo.

De acordo com Batista *et al.,* (2006), para serem considerados tensoativos eficientes, os biossurfactantes e os surfactantes sintéticos devem reduzir a tensão superficial em relação com a da água, 72 m/Nm, para valores inferiores a 40 m/Nm. Segundo Nitschke e Pastore (2005), mais de 55% dos surfactantes durante as primeiras 24 horas de cultivo atingem os valores mínimos da tensão superficial, cerca de 40 m/Nm.

A alta redução da tensão superficial nas primeiras 3 horas de fermentação e a etabilização da redução desse parâmetro ao longo do tempo pode ser devido ao consumo dos nutrientes imediato pelo microrganismo, resultando no desenvolvimento do microrganismo nas primeiras horas de fermentação.

Bezerra (2012), produziu biossurfactante a partir de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como substrato a manipueira. Para efeito comparativo, o meio diluído em (1:1) obteve 25 % de redução da tensão superficial e o meio suplementado com nutrientes reduziu 30 % após 24 horas de fermentação.

Apesar dos estudos apontarem um aumento na redução da tensão superficial, a adição de sais comerciais, fontes de nitrogênio e carbono ao substrato poderia afetar o custo do processo e também anular a utilização de resíduos orgânicos como fonte de nutrientes.

4.2 Índice de Emulsão

Devido a característica anfifílica, os biossurfactantes apresentam a capacidade de formar emulsões e estabilizá-las.

O índice de emulsão pode estar relacionado com o tempo de agitação e a quantidade de nutrientes no preparo da cultura. Os maiores valores de atividade emulsionante detectados para os cultivos agitados em maior velocidade podem estar ligados à função fisiológica dos emulsionantes microbianos. Amaral *et al*., (2006) sugere que a produção de bioemulsionantes pode aumentar a solubilização de substratos insolúveis em água e, consequentemente, facilitar o transporte de nutrientes para os microrganismos e quanto maior o estresse cisalhante, maior a excreção de biossurfactantes já que o tempo de contato das gotas da fase orgânica, dispersas em água, com os microrganismos se torna mais difícil.

A Tabela 7 apresenta os índices de emulsão resultantes do processo fermentativo utilizando substrato diluído em 40%.

Tabela 7- Índice de emulsão de acordo com a relação óleo/biossurfactante, com substrato diluído em 40%.

Amostras	Tempo (h)	Índice de Emulsão (%)	
		Óleo de Soja	Querosene
1	1	10	10,53
2	3	5,263	10,53
3	5	5,263	16,67
4	7	11,111	29,41
5	9	10,526	23,53
6	24	5,556	11,76

Em todas as amostras ocorreu a formação da emulsão, obtendo os valores mais expressivos após o período de 7 horas de fermentação, o qual coincidiu com os resultados do teste de redução da tensão superficial. No entanto, foram obtidos valores inferiores a 30 %.

O aumento do índice de emulsão pode estar relacionado com a viscosidade dos fluídos utilizados. Após os testes de emulsão com o óleo de soja e o querosene, foi realizado o teste de emulsificação adicionando óleo de motor, o qual obteve cerca 33,3 % de emulsão durante o período de fermentação de 24 horas.

Pereira *et al*., (2013) utilizaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio como meio de cultivo para a produção de biossurfactantes a partir de três variações do *Bacillus subtilis*. Entre as fontes de carbono avaliadas, acetato de sódio, citrato de sódio, frutose, glicose, glicerol, n-hexadecano, lactose, extrato de carne, parafina, sacarose, triptona e extrato de leveduras, a sacarose e a glicose obtiveram os maiores índices de emulsão para os três isolados, cerca de 39 %. Enqanto, Silva *et al*., (2014) produziram biossurfactante utilizando *Pseudomonas cepacian*, e avaliaram o índice de emulsão utilizando os óleos motor, milho e soja no período de 120 dias. O primeiro óleo apresentou os maiores índices de emulsão, reduziu nos primeiros 30 dias cerca de 55 %, enquanto que os outros óleos variaram ao longo dos 30 dias, entre 20 a 40 % a emulsificação.

Paraszkiewicz *et al*., (2018) testaram os extratos de beterraba, da casca da maçã e da casca da cenoura como meio de crescimento bacteriano das cepas de *Bacillus subtilis*, e verificaram que a composição dos resíduos utilizados influencia sobre o tipo e a quantidade de

biossurfactante produzido. Todos os resíduos testados produziram iturina tipo A que possui atividade antibiótica e surfactina, mas em diferentes quantidades.

De acordo com Sobrinho *et al*., (2008), os microrganismos produtores de tensoativos podem ser divididos em dois grupos: o primeiro que produz biossurfactante com baixo peso molecular, mas usualmente não são capazes de formar emulsões estáveis e o segundo grupo que produz polímeros que primariamente atuam como estabilizantes de emulsões, mas não afetam a tensão superficial. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode ser concluído que o biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial, mas não obteve resultados expressivos na formação de emulsões estáveis.

4.3 Testes de Estabilidade

Diversos estudos têm demonstrado que o comportamento dos microrganismos e suas diferentes linhagens tendem a resultados distintos quando expostos a diferentes condições de temperatura, pH ou composição do meio.

Para a realização dos testes de estabilidade foram utilizadas novas fermentações com as melhores condições, isto é, o substrato diluído em 40% e tempo total de 24 horas.

4.3.1 Estabilidade térmica

A temperatura é um dos fatores ambientais que pode afetar o crescimento e a sobrevivência de microrganismos em temperaturas superiores a 40 ºC, os processos microbiológicos podem ser danificados e, portanto, as reações enzimáticas não ocorrem, causando a interrupção das funções biológicas (Barros *et al*., 2010).

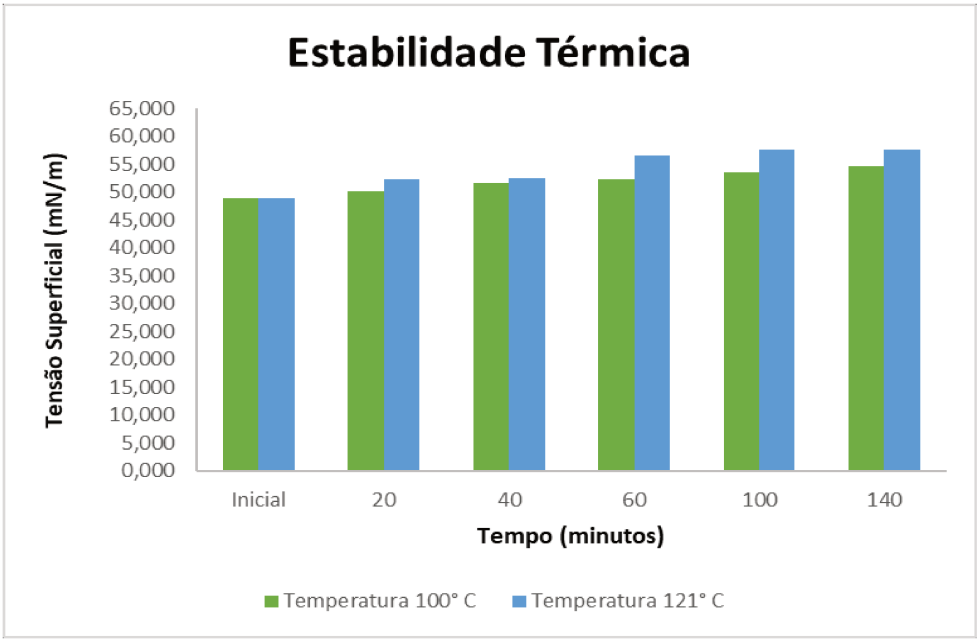
O biossurfactante produzido para o teste de estabilidade térmica foi fermentado durante o período de 24 horas, no qual ocorreu uma redução da tensão superficial de 23,8 %, em seguida, o biossurfactante produzido foi submetido a diferentes temperaturas por 140 minutos.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos referente a variação da tensão superficial do biossurfactante quando exposto a diferentes temperaturas de 100° C e 121° C, conforme metodologia utilizada.

Tabela 8- Valores da tensão superficial do biossurfactante após variação de temperatura.

Tempo (minutos)	Tensão Superficial (mN/m) 100 °C	Tensão Superficial (mN/m) 121 °C
Inicial	48,96	48,96
20	50,25	52,25
40	51,73	52,53
60	52,41	56,62
100	53,64	57,68
140	54,59	57,65

Figura 17- Análise da tensão superficial após exposição das amostras à temperatura de 100 °C e 121 ºC.



Conforme mostrado na Figura, 16 o biossurfactante não mostrou estabilidade quando exposto as temperaturas de 100° C e 121° C, durante os períodos de 20, 40, 60, 100 e 140 minutos, perdendo sua capacidade tensoativa ao longo do tempo.

A Tabela 9 compara a tensão superficial ao longo do período de 140 minutos exposto a temperatura de 100° C, com a tensão superficial da pré-fermentação, no tempo zero (64,25 mN/m).

Tabela 9- Redução da tensão superficial comparada a tensão superficial no tempo zero da fermentação, exposto a temperatura de 100 °C.

Amostra	Tempo (minutos)	Redução da Tensão Superficial (%)
Inicial	-	23,79
1	20	21,79
2	40	19,48
3	60	18,43
4	100	16,51
5	140	15,04

De maneira semelhante, a Tabela 10 compara a tensão superficial durante o período de 140 minutos exposto a temperatura de 121 °C, com a tensão superficial de pré-fermentação (64,25 mN/m).

Tabela 10- Redução da tensão superficial comparada a tensão superficial no tempo zero da fermentação, exposto a temperatura de 121 °C.

Amostra	Tempo (minutos)	Redução da Tensão Superficial (%)
Inicial	0	23,79
1	20	18,68
2	40	18,24
3	60	11,88
4	100	10,22
5	140	10,27

O biossurfactante quando exposto à temperatura de 100 °C, se mostrou ativo nos primeiros 20 minutos, reduzindo em 21,8 % a tensão superficial. Quando exposto a temperatura de 121 °C, o biossurfactante manteve a estabilidade no intervalo entre 20 e 40 minutos, mas perdeu sua capacidade tensoativa, ocorrendo uma redução da tensão superficial para 18,2 %.

A estabilidade térmica pode variar de uma linhagem para outra de microrganismo, portanto é necessário realizar diversos testes para determinar qual o melhor microrganismo e condições de fermantação favoráveis para obter-se o tensoativo com características e funções desejadas. Barros *et al*., (2008) estudaram a estabilidade do biossurfactante produzido pela

linhagem LB5a de *Bacillus subtilis*, cultivado em manipueira, os resultados mostraram que o biossurfactante possui estabilidade à temperatura de 100 °C por 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos. Enquanto, Nitschke e Pastore (2005) submeteram o biossurfactante produzido por *Bacillus subitilis,* cultivado também em manipueira, a temperaturas de 121 °C e obtiveram estabilidade por 20 minutos.

4.3.2 Estabilidade frente ao pH

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos estudando os efeitos do pH em relação a tensão superficial do biossurfactante, nas proporções de 1:1 e 1:2, (solução tampão fosfato: biossurfactante).

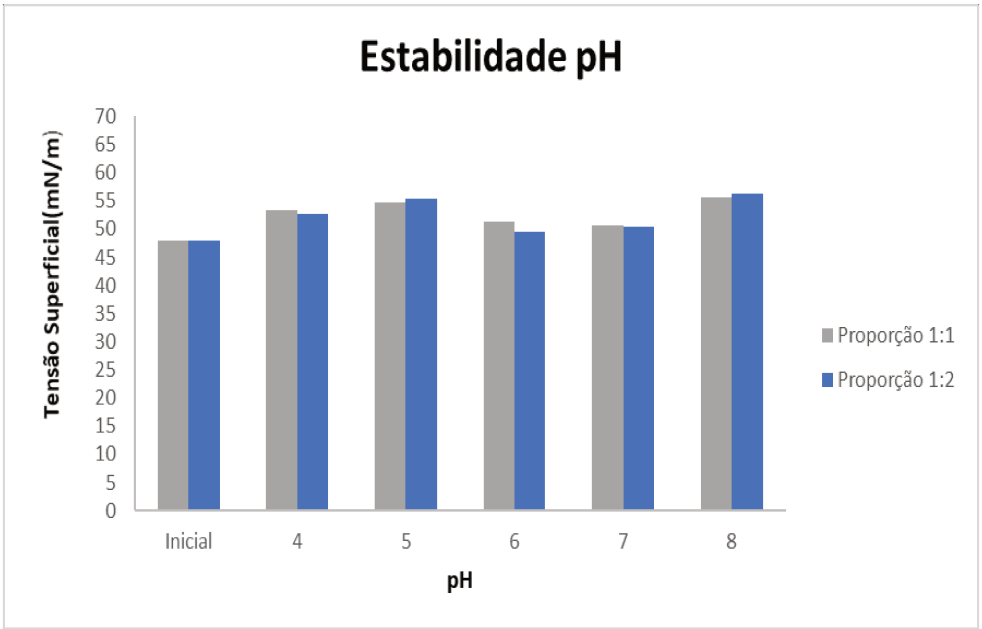
O biossurfactante utilizado no teste de estabilidade frente ao pH foi fermentado durante 24 horas com redução da tensão superficial de 24,7 %.

Tabela 11- Valores da tensão superficial do biossurfactante após variação do pH nas duas proporções.

pH	Tensão Superficial Concentração (1:1) (mN/m)	Tensão Superficial Concentração (1:2) (mN/m)
Inicial	47,95	47,95
4	53,38	52,76
5	54,68	55,35
6	51,41	49,63
7	50,72	50,51
8	55,540	56,222

Os resultados mostram uma pequena variação na tensão superficial em relação a proporção utilizada de solução tampão fosfato e biossurfactante, em diferentes faixas de pH, conforme Figura 17.

Figura 18- Análise da tensão superficial após exposição das amostras à diferentes faixas de pH nas proporções 1:1 e 1:2.



A partir dos resultados obtidos, foi observado que quando utilizado a proporção 1:1 (solução tampão fosfato: biossurfactante) houve maior estabilidade na tensão superficial na faixa de pH 6 e 7, alcançando os valores de 51,413 mN/m e 50,721 mN/m, respectivamente. De modo semelhante, quando exposto ao pH 6, 49,627 mN/m e pH 7, 50,512 mN/m, a proporção 1:2 obteve os menores valores de tensão superficial.

Em referência a tensão superficial de pré-fermentação (63,642 mN/m), a Tabela 12 analisa que houve diminuição na redução da tensão superficial em meio ácido, pH 4, e em meio básico, pH 8. Enquanto que, quando exposto a uma faixa de pH próximo a neutralidade, o biossurfactante produzido reduziu a tensão superficial em 20,3 %.

Tabela 12- Redução da tensão superficial obtida após variação de pH na proporção 1:1.

Amostra	pH Proporção (1:1)	Redução da Tensão Superficial (%)
Inicial	-	24,66
1	4	16,12
2	5	14,07
3	6	19,21
4	7	20,30
5	8	12,73

Na proporção 1:2 (solução tampão fosfato: biossurfactante), os resultados confirmaram os dados obtidos na proporção 1:1, ocorrendo uma maior redução da tensão superficial na faixa de pH 6 e 7, 22,022 % 20,631 %, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13- Redução da tensão superficial obtida após variação de pH na proporção 1:2.

Amostra	pH Proporção (1:2)	Redução da Tensão Superficial (%)
Inicial	-	24,66
1	4	17,10
2	5	13,03
3	6	22,02
4	7	20,63
5	8	11,66

A partir da análise dos resultados obtidos, percebe-se que o biossurfactante produzido não se mostrou estável quando exposto a meios ácidos e alcalinos, uma hipótese a ser considerada é a precipitação da surfactina, ocasionando a perda de solubilidade do meio e consequentemente o aumento da tensão superficial.

Estudos realizados por Rossmann (2008), utilizando melaço e manipueira como substrato e consórcios bacterianos na síntese do biossurfactante, os resultados mostraram a influência do pH na propriedade de emulsão e constatou que para pH abaixo de 4, as emulsões não foram estáveis e que aumentando para valores acima de 6, houve formação da camada emulsificante, constatando a eficiência do biossurfactante em meio neutro.

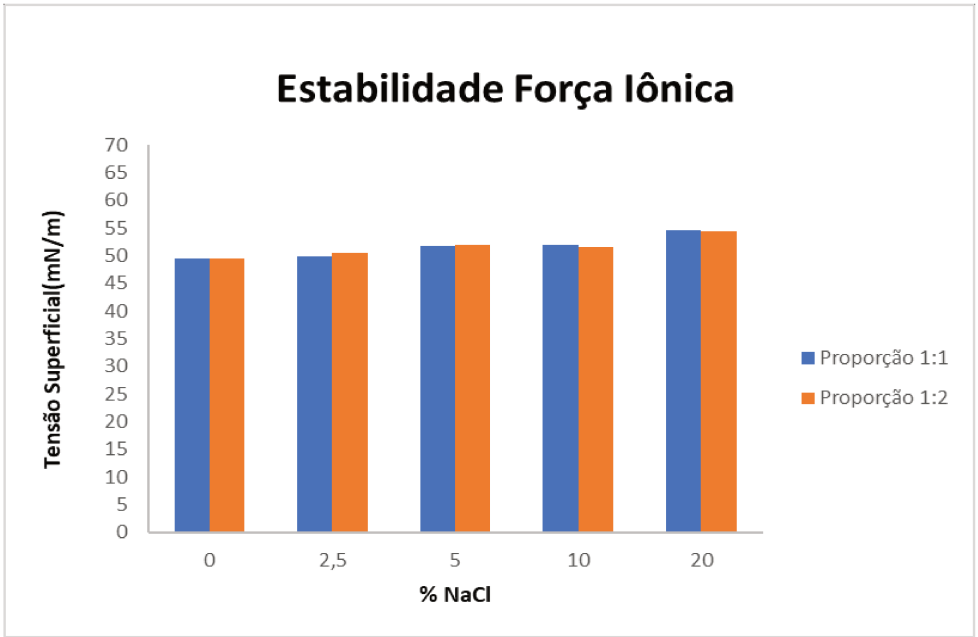
4.3.3 Estabilidade frente à força iônica

Utilizando o biossurfactante produzido após 24 horas de fermentação, com redução da tensão superficial de 23,84 %, foram preparadas amostras contendo cloreto de sódio em concentrações entre 2,5 % e 20 %, nas proporções de 1:1 e 1:2 (solução de cloreto de sódio: biossurfactante), em seguida a tensão superficial foi analisada pelo método do peso da gota, conforme apresentado na Tabela 14 e Figura 18.

Tabela 14- Valores da tensão superficial do biossurfactante após variação a força iônica nas duas proporções.

% NaCl	Tensão Superficial (mN/m) 1:1	Tensão Superficial (mN/m) 1:2
Inicial	49,51	49,51
2,5	49,98	50,42
5	51,63	51,89
10	51,95	51,55
20	54,61	54,32

Figura 19- Análise da tensão superficial após exposição das amostras à diferentes faixas de força iônica nas proporções 1:1 e 1:2.



Como no teste de estabilidade frente a mudança de pH, não ocorreram variações significativas com a alteração da proporção de 1:1 para 1:2 de cloreto de sódio adicionado ao biossurfactante, os resultados apontaram uma diferença na tensão superficial quando alterado a concentração da solução de cloreto de sódio nas amostras de 2,5% a 20 %.

A Tabela 15 compara a tensão superficial das amostras expostas a adição de cloreto de sódio na proporção (1:1) com a tensão superficial pré-fermentação (65,012 mN/m).

Tabela 15- Redução da tensão superficial obtida após variação da força iônica na proporção 1:1.

Amostra	NaCl (%) Proporção (1:1)	Redução da Tensão Superficial (%)
Inicial	-	23,84
2	2,5	23,12
3	5	20,59
4	10	20,10
5	20	16,00

Os resultados obtidos utilizando a adição de solução salina na proporção 1:1 (cloreto de sódio: biossurfactante), indicaram que houve maior desvio na redução da tensão superficial e perda da capacidade tensoativa na amostra 5 (16 %), adicionando 20% de NaCl. Este resultado foi confirmado, utilizando a proporção 1:2, no qual a redução da tensão superficial reduziu para 16,45 %, conforme Tabela 16.

Tabela 16- Redução da tensão superficial obtida após variação da força iônica na proporção 1:2.

Amostra	NaCl (%) Proporção (1:2)	Redução da Tensão Superficial (%)
Inicial	-	23,84
2	2,5	22,44
3	5	20,19
4	10	20,71
5	20	16,45

Com os resultados obtidos foi evidenciado que, o biossurfactante manteve estabilidade frente à força iônica com adição de 2,5 % de cloreto de sódio, tanto nas diluições de 1:1 como 1:2, observou- se que a tensão superficial não foi alterada significativamente utilizando as concentrações de 5 e 10 % de cloreto de sódio, ocorrendo a perda da atividade tensoativa quando exposto a diluição de 20 % de cloreto de sódio.

Soares (2014) utilizando o biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus sp*, constatou que para concentrações de sal de 10 a 30 g/L, os valores de tensão superficial permaneceram constante, enquanto que utilizando valores superiors a 40 g/L ocorreu aumento

na tensão superficial. No entanto, apenas os experimentos realizados com 10 g/L de NaCl apresentaram estabilidade ao longo do tempo de 72 horas. De maneira semelhante, Barros *et al*., (2008) utilizando o biossurfactante produzido pela linhagem LB5a de *Bacillus subtilis*, cultivado em manipueira, obtiveram estabilidade utilizando concentração de 2,5 até 20 % de NaCl.

Os biossurfactantes suportam geralmente concentrações de até 10 % de NaCl, o qual possibilita, por exemplo, a utilização deste em biorremediações. Enquanto que surfactantes sintéticos podem se tornar inativos quando expostos a concentração salina de 3% (Soares, 2014)

4.4 Remoção de Óleo em Solo Contaminado

A biorremediação é um processo que depende da natureza e da quantidade de óleo ou hidrocarbonetos presentes, além disso, resíduos oleosos depende da capacidade de assimilação desses compostos pelos microrganismos envolvidos no processo de produção dos biossurfactantes. Após o período de 24 horas da fermentação, foram medidos o poder tensoativo do composto, assim como nos testes de tensão superficial e estabilidade, conforme mostrado na Tabela 17.

Tabela 17- Tensão superficial de pré- fermentação e após 24 horas de fermentação.

Tensão Superficial Pré- Fermentação (mN/m)	**Tensão Superficial Após 24 h de Fermentação (mN/m)**
64,25	49,98

As amostras de areia contaminadas com óleo de motor foram tratadas com o biossurfactante produzido ativo, com redução da tensão superficial de aproximadamente 22 % e água destilada, para controle, após o período de 24 horas de contato e agitação, A Tabela 18 apresenta os resultados da tensão superficial das amostras.

Tabela 18- Tensão superficial- Teste de biorremendiação.

Amostras	Tensão Superficial (mN/m)
Controle	69,64
1	51,68
2	52,21
3	50,34

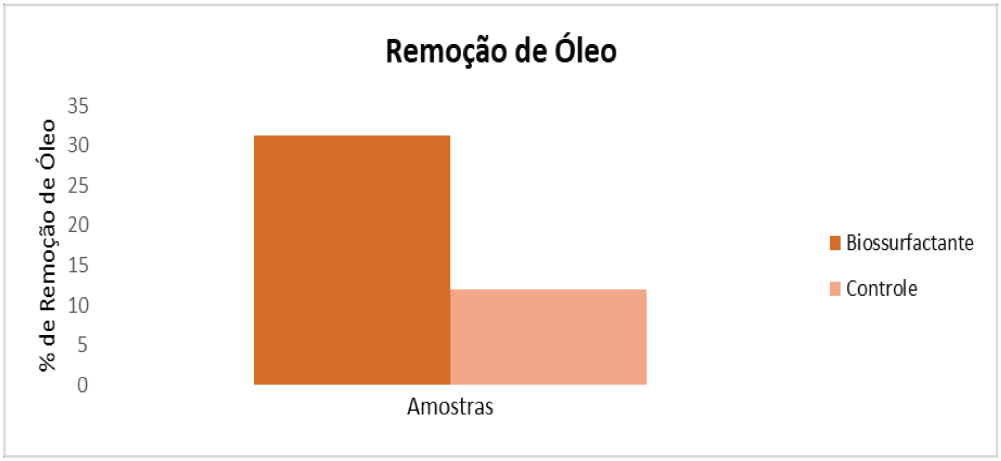
Comparando os resultados obtidos, pode-se observar que o biossurfactante após tratamento da areia contaminada com óleo de motor, se mostrou ativo e estável nas 3 amostras, reduzindo cerca de 20 % a tensão superficial, em relação a tensão superficial inicial (64,252 mN/m).

Os resultados obtidos do percentual de remoção de óleo de motor presente em cada amostra de areia quando tratada com o biossurfactante produzido e com água destilada são analisados de acordo com a Tabela 19 e Figura 19.

Tabela 19- Remoção do óleo de motor na areia contaminada.

Amostras	% de Remoção do óleo
Controle	11,99
1	32,67
2	32,05
3	29,26

Figura 20- Comparativo da remoção do óleo de motor na areia contaminada utilizando biossurfactante e com água destilada.



Neste teste foi observado a remoção de cerca de 31,3 % do óleo de motor na fase liquida a partir da medição gravimétrica durante o período de 24 horas, o que confirma a capacidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em auxiliar no processo de biorremediação de solos contaminados.

Diversos estudos avaliaram o processo de biorremediação em diferentes períodos de tratamento com diversos contaminantes e obtiveram resultados positivos.

Barros (2010), constatou no decorrer de 20 dias da contaminação artificial do solo com óleo diesel puro a maior redução, 30 %, de hidrocarbonetos totais de petróleo na camada superficial do solo, quando exposto ao tensoativo produzido a partir do *Bacillus subtilis*. Enquanto, Luna et al., (2009) obtiveram, após 24 horas de exposição, uma remoção do óleo de motor presente na areia de 63,6 % utilizando o biossurfactante produzido por *Candida glabrata*. Deon *et al*., (2012), utilizaram microrganismos de natureza lipídica no processo de biorremediação de solos contaminados com diferentes óleos. Após 21 dias, as remoções de óleo de soja, óleo diesel e óleo lubrificante foram de 87,8 %, 41,6 % e 18,5 %, respectivamente.

A variação da porcentagem de remoção do óleo em solos contaminados pode variar não só com o microrganismo e meio de cultivo utilizado no processo de obtenção do biossurfactante, mas também com a qualidade do óleo. De acordo com Lopes *et al*., (2010), óleos usados possuem maior biodegradabilidade do que os óleos novos, mas o óleo usado apresenta elevado potencial tóxico para os organismos, concluindo que a compreensão do comportamento ambiental destes compostos é de extrema importância para um eficaz processo de biorremediação em áreas contaminadas.

5. CONCLUSÃO

Os surfactantes sintéticos são considerados prejudiciais ao meio ambiente, por serem tóxicos e não apresentarem biodegradabilidade. A procura de biossurfactantes está aumentando nos últimos anos, pois são produtos mais versáteis e podem ser utilizados em diversos setores indústriais. A desvantagem apresentada pelos surfactantes biológicos é o alto custo de produção, uma alternativa viável é a utilização de substratos renováveis, que além de reduzir custos de produção, em aproximadamente 30 %, colabora com o descarte dos mesmos.

O *Bacillus subtilis* demonstrou ser um microrganismo capaz de produzir biossurfactante utilizando o processamento da casca da laranja como fonte de nutriente.

A partir das análises realizadas experimentalmente, foi observado que houve a produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis*, de modo que os melhores resultados obtidos, utilizando o substrato diluído em 40%, alcançaram uma redução da tensão superficial de 25%.

Os índices de emulsão não foram favoráveis tanto utilizando óleo de soja como querosene, obtendo valores inferiores a 30 %. O maior índice de emulsão, 33,33 %, foi obtido utilizando óleo de motor, estudos apontam que o baixo índice de emulsificação pode estar ligado a linhagem do microrganismo, as funções fisiológicas e o tipo de óleo utilizado. Portanto é necessário realizar novas análises para verificação de tais parâmetros.

No estudo da estabilidade, este biossurfactante não mostrou estabilidade térmica, no entanto para pH próximo a neutralidade e acréscimo de solução salina de até 2,5 %, a tensão superficial obteve menores oscilações, mantendo os valores mínimos encontrados.

Os resultados demonstraram que a biorremediação foi favorecida pelo uso do biossurfactante produzido, no qual foi capaz de remover, em média, 31,328 % do óleo de motor da areia, preservando a ação tensoativa e possuindo potencial para tal aplicação.

Portanto, este trabalho demonstrou que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* utilizando cascas da laranja foi eficaz, uma vez que, possui atividade tensoativa e tolerância a variação de pH e salinidade, tornando-se vantajoso em relação ao surfactante sintético.

6. TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho evidenciou a capacidade da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando o resíduo do processamento da casca da laranja, mas torna- se necessário aprimorar a produção do biossurfactante e realizar novas análises adequando diferentes condições de produção.

Verificar a cinética do processo fermentativo, avaliando a concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, como condições nutricionais do meio em função do tempo, para viabilizar o aumento da produção do biossurfactante.

Possivelmente, será necessário avaliar a suplementação do substrato, uma vez que este, pode estar relacionado com o poder tensoativo e emulsificante do biossurfactante.

Realizar a análise qualitativa do biossurfactante utilizando testes de saponificação e cromatografia, para confirmar a presença de substâncias lipídicas, e a produção do biossurfactante, respectivamente.

Medir a concentração de proteínas totais após cada teste de tesão superficial, para determinar a conversão do substrato em produto.

Nos testes de emulsão serão necessários a utilização de novos óleos com diferentes viscosidades para definir com maior precisão o poder emulsificante do biossurfactante produzido e consequentemente sua aplicação.

O teste de biorremediação obteve resultados expressivos, mas será necessário avaliar novos parâmetros como tempo de ação e diferentes contaminantes para obter as melhores condições de aplicação do biossurfactante como agente de remediação.

REFERÊNCIAS

AHMED, I.; ZIA, M.A.; HUSSAIN, M.A.; ZAIN, A.; NAVEED, M.T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences,** v. 9, n.2, p.148-154, 2016.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIALL, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus (Jack:Fr).* **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 27, n. 2, 2007.

ALI KHAN, A.H.; TANVEER, S.; ALIA, S.; ANEES, M.; SULTAN, A.; IQBAL, M.; YOUSAF, S. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. **Ecological Engineering**, v. 104, p. 158-164, 2017.

AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M., BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry,** v. 41, p. 1894-1898, 2006.

ANDRADE, C.J. **Estudo da Utilização do Glicerol Oriundo da Cadeia de Biodiesel por *Bacillus subtilis* para a Produção de Biossurfactantes, Enzimas e Aromas.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 2011.140 p. Dissertação (Mestrado).

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.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl. Environ. Microbiol,** v. 87, p. 427-444, 2010.

BARAKAT, K.M.; HASSAN, S.W.M.; DARWESH, O.M. Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated fromRed Sea, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research,** v. 43, p. 205-211, 2017

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P; MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicações em Alimentos. **Química Nova,** v. 30, 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. 24, p. 979-985, 2008.

BARROS, C. A. **Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4.** Rio de Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado).

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F.R; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Water Science and Technology,** v. 34, p. 187–194, 2006.

BEHRING, J.L. Adaptação no Método do Peso da Gota para Determinação da Tensão Superficial: um Método Simplificado para a Quantificação da CMC de Surfactantes no Ensino da Química. **Química Nova,** v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004.

BEZERRA, M.S. **Levantamento e Avaliação de Critérios para a Ampliação de Escala da Produção de Biossurfactante Utilizando Melaço como Substrato.** Natal: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, 2012. 114 p. Dissertação (Mestrado).

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.,** v. 72, p. 248, 1976.

BRASIL. Resolução CNS/MS N.º 04, de 24 de novembro de 1988. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/04_cns.pdf/a85ab159-9cc5-41b8-9ee1-512af02d1a10. Acesso em: 28 de novembro de 2017.

BUENO, S.M. **Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema modelo.** São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista- UNESP, 2008. 89 p. Tese (Doutorado).

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento- CONAB. Distrito Federal, 2017. Disponível em <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-laranja. Acesso em: 05 de setembro de 2017.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus Species*. **Appl. Env. Microbiol.,** v. 53, p. 224-229, 1987.

DEON, M.C.; ROSSI, A.; DAL MAGRO, C.; REINEHR, C.O.; COLLA, L.M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. **Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas,** v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

EHRHARDT, D.D. **Produção de Biossurfactantes por Bacillus subtilis Utilizando Resíduo do Processamento do Abacaxi como Substrato.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 2015. 72 p. Dissertação (Mestrado).

FARIA, A.F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por Bacillus subtilis em Glicerina Residual.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 2010. 173 P. Tese (Doutorado).

FERREIRA, A.; VECINO, X.; FERREIRA, D.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B.; RODRIGUES, L.R. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from Lactobacillus paracasei. **Colloids Surf B Biointerfaces,** v. 155, n.1, p.522-529, 2017.

FONTES, G.C. **Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*.** Rio de Janeiro: Escola de Química- Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 2008. 122 p. Dissertação (Mestrado).

GAJEWSKI, A. A Couple new ways of surface tension determination**. International Journal of Heat and Mass Transfer,** v. 115, part b, p.909-917, 2017.

GOMES, D. A. A. **Aplicação de Microemulsões na Solubilização de Frações Pesadas de Petróleo.** Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado).

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine Nocardiopsis sp. B4. **Desalination,** v. 285, n. 1, p.198–204, 2012a.

KLATYIK, S.; BOHUS, P.; DARVAS, B.; SZEKACS, A. Authorization and Toxicity of Veterinary Drugs and Plant Protection Products: Residues of the Active Ingredients in Food and Feed and Toxicity Problems Related to Adjuvants. **Front Vet Sci,** v. 4, n.146, 2017.

KOGAWA, A.C.; CERNIC, B.G.; COUTO, L.G.D.; SALGADO, H.R.N. Synthetic Detergents: 100 years of History. **Saudi Pharmaceutical Journal,** v. 25, n. 6, p.934-938.

LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricant oils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 454-458, 2010.

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.

MORAIS R. K.S. **Produção de biossurfactantes a partir de substratos de baixo custo.** Alagoas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas- UFAL, 2012. 130 p. Dissertação (Mestrado).

MURUGAN, T.; MURUGAN, M.; WINS, J.J.A. Screening, Production and Antibacterial Potential of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* Isolated from oil Contaminated Soil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science,** v. 38, p. 115-118, 2016.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, comercial production and application. **Current Science,** v. 94, p. 736-747, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova,** v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater. **Bioresource Technology,** v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

OLIVEIRA, D.W.F.; SOUSA, J.R.; FRANÇA, W.L.; FELIX, K.N.; MARTINS, J.J.L.; GONÇALVES, L.R.B. Kinetic Study of Biosurfactant Production by Bacillus subtilis LAMI005 grown in Clarified Cashew Apple Juice. **Journal of Biotechnology,** v. 101, p. 34-43, 2013.

PARASZKIEWICZ, K.; BERNAT, P.; KUSMIERSKA, A.; CHOJNIAK, J.; PLAZA, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal of Environmental Management,** v. 209, p. 65-70, 2018.

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

PONTES C. R.; **Enriquecimento Protéico do Bagaço de Caju Através de Fermentação Semi-Sólida Utilizando *Aspergillus niger*.** Ceará: Faculdade de Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará- UFC, 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado).

RANE, A.N.; BAIKAR V.V.; RAVI, K.V.; DEOPURKAR, R.L. Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and Its Application in Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**. v. 24, n. 8, p. 492, 2017.

ROCHA, P.M. **Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 Utilizando Melaço de Cana como Substrato.** Natal: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, 2017. 116 p. Tese (Doutorado).

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and Oil Bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 13, p. 249-252, 2002.

ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melaço e manipueira.** Viçosa: Programa de Pós-Graduação em microbiologia agrícola, Universidade de Viçosa- UFV, 2008. 130. p. Dissertação (Mestrado).

SANTOS, B.F.; FERRAZ, C.; SOUZA, R.R. Produção de Biosurfactante Utilizando Resíduos Sem Valor Comercial. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química -COBEQ,** 2010.

SANTOS, B.F.; PONEZI, A.N.; FILETI, A.M.F. Strategy for waste management in the production and application of biosurfactant through surface response methodology. **Clean Techn Environ Policy,** v. 18, p. 787-795, 2016.

SANTOS, C.M.; DWECK, J.; VIOTTO, R.S.; ROSA, A.H.; MORAIS, L.C. Application of orange peel waste in the production of solid biofuels and biosorbents. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 469-479, 2015.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO – SEAB. Fruticultura. Paraná: SEAB, 2017. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf. Acesso em: 25 de julho de 2017.

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

SILVA, J.D.F.; SILVA, Y.P.; PIATNICKIC, C.M.S.; BÖCKELD, W.J.; MENDONÇA, C.R.B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova,** v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SILVA, R.C.F.S.; ALMEIDA, D.G.; ROCHA Jr R.B.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L. A. Estudo da Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Pseudomonas cepacia* sob Tindalização Fracionada. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química -COBEQ,** 2014.

SOARES, D.W.F. **Produção e Caracterização de Biossurfactantes Obtidos por Linhagens de *Bacillus sp.* Isolados de Estações de Tratamento de Águas Residuais e de Solo de Manguezais (Ceará- Brasil).** Ceará: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará- UFC, 2014. 162 p. Tese (Doutorado).

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; LEITE, L. F. C.; SARUBBO. L. A. Utilization of two agroindustrial byproducts for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, n. 33, p. 912-917, 2008.

SOUZA, E.C.; VESSONI-PENNA, T.; PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA, R. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 89, p. 88-94, 2014.

TESSARO, D.; LARSEN, A. C.; DALLAGO, R. C.; DAMASCENO, S. G.; SENE, L.; COELHO, S. R. M. Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja. **Acta Scientiarum. Technology., Maringá**, v. 32, n. 2, p. 201-205, 2010.

VAN BOGAERT, I.N.A.; SAERENS, K.; DE MUYNCK, C.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. Microbial production and application of sophorolipids. **Appl. Microbiol. Biotechnol,** v.76, p. 23-34, 2007.

ZHANG, J.; XUE, Q.; GAO, H., LAI, H.; WANG, P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. **Microbial Cell Factories,** v.15, p. 168- 183, 2016.

ANEXOS

ANEXO A. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após a primeira fermentação utilizando substrato diluído em 60%.

Tabela A 1- Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo- 1ª Fermentação.

Leitura Inicial (Abs)	Diluição	Leitura Final (Abs)
0,861	10 mL de inóculo para 90 mL de solução (glicose, cloreto de sódio e peptona)	0,102

Tabela A 2- Dados da tensão superficial- 1ª Fermentação.

Amostra	Tempo (h)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Tempo Zero	0	0,6198	0,5876	0,6037
1	1	0,5298	0,5476	0,5387
2	3	0,5423	0,5259	0,5341
3	5	0,5311	0,5228	0,5269
4	7	0,5189	0,5337	0,5263
5	9	0,5393	0,5405	0,5399
6	24	0,5109	0,5207	0,5158

ANEXO B. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após a segunda fermentação utilizando substrato diluído em 60%.

Tabela B- Dados da tensão superficial- 2ª Fermentação.

Amostra	Tempo (h)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Tempo Zero	0	0,6028	0,6102	0,6065
1	1	0,5304	0,5113	0,5209
2	3	0,5104	0,5246	0,5175
3	5	0,5024	0,5283	0,5154
4	7	0,5075	0,517	0,5123
5	9	0,5094	0,5168	0,5131
6	24	0,5017	0,5137	0,5077

ANEXO C. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após a primeira fermentação utilizando substrato diluído em 40%.

Tabela C 1- Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo- 1ª Fermentação.

Leitura Inicial (Abs)	Diluição	Leitura Final (Abs)
0,187	10 mL de inóculo para 20 mL de solução (glicose, cloreto de sódio e peptona)	0,099

Tabela C 2- Dados da tensão superficial- 1ª Fermentação.

Amostra	Tempo (h)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Tempo Zero	0	0,6491	0,6197	0,6344
1	1	0,5684	0,5890	0,5787
2	3	0,5386	0,5421	0,5404
3	5	0,5372	0,5357	0,5365
4	7	0,5038	0,5125	0,5081
5	9	0,5061	0,5132	0,5096
6	24	0,4833	0,4926	0,4879

Tabela C 3- Dados do índice de emulsão- 1ª Fermentação.

Amostras	Tempo (h)	Óleo de Soja		Querosene	
		Altura Camada Emulsão (cm)	Altura Total (cm)	Altura Camada Emulsão (cm)	Altura Total (cm)
Inicial	0	-	2	-	2
1	1	-	2	0,1	1,9
2	3	0,1	2	0,1	1,9
3	5	0,1	1,9	0,3	1,8
4	7	0,1	2	0,3	1,7
5	9	0,2	1,9	0,2	1,9
6	24	0,2	1,9	0,2	1,9

ANEXO D. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após a segunda fermentação utilizando substrato diluído em 40%.

Tabela D 1- Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo- 2ª Fermentação.

Leitura Inicial (Abs)	Diluição	Leitura Final (Abs)
0,562	10 mL de inóculo para 60 mL de solução (glicose, cloreto de sódio e peptona)	0,095

Tabela D 2- Dados da tensão superficial- 2ª Fermentação.

Amostra	Tempo (h)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Tempo Zero	0	0,6563	0,6373	0,6468
1	1	0,5816	0,6196	0,6006
2	3	0,5573	0,575	0,5662
3	5	0,5335	0,5367	0,5351
4	7	0,5188	0,5157	0,5173
5	9	0,5204	0,5161	0,5183
6	24	0,4809	0,4865	0,4837

Tabela D 3- Dados do índice de emulsão- 2ª Fermentação.

Amostras	Tempo (h)	Óleo de Soja		Querosene	
		Altura Camada Emulsão (cm)	Altura Total (cm)	Altura Camada Emulsão (cm)	Altura Total (cm)
Inicial	0	-	2	-	2
1	1	0,2	2	0,2	1,9
2	3	0,1	1,9	0,2	1,9
3	5	0,1	1,9	0,3	1,8
4	7	0,2	1,8	0,5	1,7
5	9	0,2	1,9	0,4	1,7
6	24	0,1	1,8	0,2	1,7

ANEXO E. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação utilizando substrato diluído 40% para os testes de estabilidade e biorremediação.

Tabela E 1- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade térmica- 100° C.

Amostra	Tempo (min)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Inicial	-	0,4867	0,5008	0,49375
1	20	0,5118	0,5048	0,5083
2	40	0,521	0,5089	0,51495
3	60	0,535	0,5191	0,52705
4	100	0,5282	0,5445	0,53635
5	140	0,4867	0,5008	0,49375

Tabela E 2- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade térmica- 121° C.

Amostra	Tempo (min)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Inicial	-	0,4867	0,5008	0,49375
1	20	0,4881	0,5387	0,5134
2	40	0,5231	0,5092	0,51615
3	60	0,5452	0,5674	0,5563
4	100	0,5765	0,557	0,56675
5	140	0,5592	0,5737	0,56645

Tabela E 3- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à variação de pH- Proporção 1:1.

Amostra	pH	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Inicial	-	0,4862	0,496	0,48575
1	4	0,5351	0,5139	0,5245
2	5	0,5334	0,5412	0,5373
3	6	0,5191	0,4912	0,50515
4	7	0,5015	0,4952	0,49835
5	8	0,5537	0,5377	0,5457

Tabela E 4- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à variação de pH- Proporção 1:2.

Amostra	pH	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Inicial	-	0,4862	0,496	0,48575
1	4	0,536	0,5007	0,51835
2	5	0,5375	0,5502	0,54385
3	6	0,4922	0,483	0,4876
4	7	0,4908	0,5018	0,4963
5	8	0,5446	0,5602	0,5524

Tabela E 5- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à força iônica- Proporção 1:1.

Amostra	NaCl (%)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Inicial	-	0,4762	0,4968	0,4865
1	2,5	0,4798	0,5023	0,49105
2	5	0,5011	0,5134	0,50725
3	10	0,517	0,5038	0,5104
4	20	0,531	0,5421	0,53655

Tabela E 6- Dados da tensão superficial- Teste de estabilidade frente à força iônica- Proporção 1:2.

Amostra	NaCl (%)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Inicial	-	0,4762	0,4968	0,4865
1	2,5	0,5036	0,4872	0,4954
2	5	0,5091	0,5105	0,5098
3	10	0,5148	0,4982	0,5065
4	20	0,526	0,5414	0,5337

Tabela E 7- Dados da tensão superficial- Teste de biorremediação.

Amostra	Tempo (h)	Peso de 10 gotas de biossurfactante		
		I (g)	II (g)	Média (g)
Controle	24	0,6697	0,6987	0,6842
1	24	0,4822	0,5003	0,4913
2	24	0,5073	0,5286	0,5179
3	24	0,5248	0,4975	0,5112