



DANIELA DINIZ EHRHARDT

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *BACILLUS*
SUBTILIS UTILIZANDO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DO ABACAXI COMO SUBSTRATO**

CAMPINAS
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

DANIELA DINIZ EHRHARDT

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR BACILLUS SUBTILIS UTILIZANDO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DO ABACAXI COMO SUBSTRATO

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
DANIELA DINIZ EHRHARDT E ORIENTADO PELO PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "E.B.T.", is positioned above the text "Assinatura do Orientador".

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizângela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

Eh86p Ehrhardt, Daniela Diniz, 1985-
Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato. / Daniela Diniz Ehrhardt. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using the residue from the processing of pineapple as substrate

Palavras-chave em inglês:

Biotechnology

Biosurfactants

Fermentation

Bacillus subtilis

Surfactin

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Elias Basile Tambourgi

Juliana Ferrari Ferreira Secato

Ana Paula Brescancini Rabelo

Data de defesa: 07-02-2015

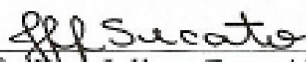
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Assinaturas

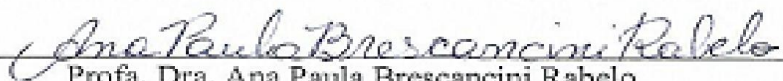
Dissertação de mestrado defendida por Daniela Diniz Ehrhardt em 02 de fevereiro de 2015
e aprovada pela banca constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi (Orientador)



Profa. Dra. Juliana Ferrari Ferreira Secato



Profa. Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo

Dedico este trabalho aos meus avós, Maria Helena e Júlio Diniz,
que me ensinaram que o conhecimento é o bem mais precioso
que podemos ter e é o único que ninguém pode tirar de nós.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades por Ele dadas;

Ao professor Elias Basile Tambourgi, pela orientação, dedicação, conselhos e ensinamentos prestados;

À minha mãe, Maria Aparecida, pelo constante apoio, pelos conselhos dados, ajuda nos momentos mais difíceis e, principalmente, pelo amor incondicional;

Ao meu pai, João Paulo, pelo carinho, apoio e preocupação durante todo o meu caminho;

À minhas irmãs, Débora e Daiane, pelo cuidado e amor;

Ao Bruno, imprescindível em minha vida, pelo amor, carinho, paciência e por aceitar e apoiar minhas escolhas;

Ao meu amigo Leandro, com sua paciência e dedicação nas aulas de cálculo;

À Juliana, que me ensinou grande parte do que sei hoje e não exitou em me ajudar nos meus intermináveis experimentos;

Aos meu colegas do laboratório de biosseparação II, André, Amanda , Thamyris e Diego, que, além de me ajudarem, tornaram meu dia-a-dia mais alegre;

À CAPES pelo auxílio financeiro ao projeto e à bolsa concedida.

“O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a
veemência e perseverante energia de sua alma a um fim,
vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo fará,
pelo menos, coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

O crescente comprometimento com questões ambientais, juntamente com as novas legislações vigentes fizeram com que o uso de surfactantes sintéticos se tornasse inviável pela indústria. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de biossurfactantes aumentou consideravelmente. Biossurfactantes são grupos de compostos químicos produzidos por microrganismos através da biodegradação de matérias-primas renováveis. A utilização de biossurfactantes tornou-se uma alternativa bastante interessante em substituição aos surfactantes sintéticos, pois geram menor impacto ambiental devido à sua biodegradabilidade, diversidade estrutural e baixa toxicidade. Entretanto, os altos custos de produção são fatores limitantes para sua aplicação industrial. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a produção de biossurfactante, através da fermentação do resíduo do processamento do abacaxi, por *Bacillus subtilis*, a 37° C. O resíduo do abacaxi como substrato de fonte renovável garante o baixo custo na produção do surfactante microbiológico, uma vez que este fruto é extensivamente cultivado no Brasil. Foram realizadas fermentações com três diferentes concentrações de glicose (1%, 3%, 5%) e, posteriormente, enriquecendo o substrato com glicerol comercial (3%, 5% e 10%). Foram realizados testes de tensão superficial e índice de emulsão e observou-se melhores resultados com 5% de glicose e sem adição de glicerol, com redução da tensão em 25% e índices de emulsão de 67%, entretanto não foi observado estabilidade do biossurfactante produzido quando expostos à condições extremas de temperatura (100°C e 121°C), variação de pH de 4 a 8 e frente à força iônica com soluções de NaCl em concentrações de 2,5%, 5%, 10% e 20%.

Palavras chave: Biotecnologia, biossurfactantes, produção de biossurfactantes, *Bacillus subtilis*, surfactina, subtilisina.

ABSTRACT

The growing commitment to environmental issues, with the new current legislation made the use of synthetic surfactants become unviable in industry. Thus, the development of new technologies for producing biosurfactants increased considerably. Biosurfactants are groups of chemical compounds produced by microorganisms by biodegradation renewable raw materials. The use of biosurfactants has become an interesting alternative to replace synthetic surfactants because they generate less environmental impact due to their biodegradability, low toxicity and structural diversity. However, the high production costs are limiting factors for their industrial application. Therefore, this study aimed to produce biosurfactant by *Bacillus subtilis* at 37 °C, using the residue from processing of pineapple as substrate. The pineapple residue as a renewable source substrate ensures low cost production of microbial surfactant, since this fruit is extensively cultivated in Brazil. Fermentations were performed at three different glucose concentrations (1%, 3%, 5%) and then enriching the substrate with commercial glycerol (3%, 5% and 10%). The surface tension and emulsion index analysis showed that the best results was with 5% glucose and without glycerol, with tension reduction of 25% and emulsion index of 67%. However, was observed that the biosurfactant produced wasn't stable when exposed to extreme conditions of temperature (100 ° C and 121 ° C), pH range 4 to 8 and ionic strength of NaCl solutions with concentrations of 2.5%, 5%, 10% and 20%.

Key word: Biotechnology, biosurfactants, biosurfactants production, *Bacillus subtilis*, surfactin, subtilisin.

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	xiii
<u>ABSTRACT</u>	xv
<u>SUMÁRIO</u>	xvii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xxi
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xxii
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1 Surfactantes e Biossurfactantes.....	4
2.1.1 Classificação dos biossurfactantes.....	7
2.1.2 Função fisiológica dos biossurfactantes.....	10
2.1.3 Propriedades dos biossurfactantes.....	11
2.2 Produção de biossurfactantes.....	12
2.2.1 Avaliação da efetividade do biossurfactante produzido.....	13
2.3 Aplicações dos Biossurfactantes.....	14
2.3.1 Biorremediação.....	16
2.3.2 Indústrias de Alimentos.....	18
2.3.3 Aplicações terapêuticas.....	18
2.4 Utilização de substratos renováveis.....	19
2.5 <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.6 Abacaxi.....	22
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	26
3.1 Materiais.....	26
3.2 Métodos.....	27

3.2.1 Cultivo do microrganismo.....	27
3.2.1.1 Processo de repique.....	27
3.2.1.2 Meio de cultura para conservação das cepas.....	27
3.2.2 Produção do biossurfactante.....	28
3.2.2.1 Preparo do pré inóculo.....	28
3.2.2.2 Preparo do substrato.....	29
3.2.2.3 Processo Fermentativo.....	29
3.2.3 Enriquecimento com glicerol.....	29
3.2.4 Medida da tensão superficial.....	30
3.2.4.1 Método do peso da gota.....	30
3.2.5 Índice de emulsão.....	30
3.2.6 Testes de estabilidade.....	30
3.2.6.1 Estudo da estabilidade térmica.....	31
3.2.6.2 Estudo da estabilidade frente o pH.....	31
3.2.6.3 Estudo da estabilidade frente à força iônica.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1 Fermentações com variação da concentração de glicose.....	32
4.1.1 Tensão superficial.....	32
4.1.2 Índice de emulsão.....	37
4.1.3 Análise do pH.....	40
4.2 Análise com glicerol.....	41
4.2.1 Tensão superficial.....	42
4.2.2 Índice de Emulsão.....	46
4.2.3 Análise do pH.....	48
4.3 Testes de estabilidade.....	49
4.3.1 Estabilidade frente à temperatura.....	50
4.3.2 Estabilidade frente à força iônica.....	52
4.3.3 Estabilidade frente à alteração de pH.....	53

<u>5. CONCLUSÕES</u>	56
<u>6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS</u>	58
<u>REFERÊNCIAS</u>	59
<u>ANEXOS</u>	67
ANEXO A.....	67
ANEXO B.....	68
ANEXO C.....	69
ANEXO D.....	70
ANEXO E.....	71
ANEXO F.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos biossurfactantes e produção de micelas.....	5
Figura 2. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.....	10
Figura 3. Principais países produtores de abacaxi em 1997.....	23
Figura 4. Levantamento sistemático das produções agrícolas de abacaxi nas regiões do Brasil.....	25
Figura 5. Demonstrativo do processo de repique do microrganismo.....	27
Figura 6. Tubos de repique contendo ágar nutriente.....	28
Figura 7. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com 1% de glicose.....	33
Figura 8. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com 3% de glicose.....	35
Figura 9. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com 5% de glicose.....	36
Figura 10. Imagens das amostras após produção de biossurfactantes com 5% de glicose.....	37
Figura 11. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 3% de glicerol.....	43
Figura 12. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 5% de glicerol.....	44
Figura 13. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 10% de glicerol.....	45
Figura 14. Análise da tensão superficial após exposição das amostras à temperatura de 100°C.....	51
Figura 15. Análise da tensão superficial após exposição das amostras à temperatura de 121°C.....	51
Figura 16. Análise da tensão superficial após adição de solução de NaCl, na proporção 1:1.....	52
Figura 17. Análise da tensão superficial após adição de solução de NaCl, na proporção de 1:2.....	53
Figura 18. Gráfico comparativo das tensões superficiais obtidas nas duas proporções, em diferentes valores de pH.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos biossurfactantes de acordo com o microrganismo produtor.....	9
Tabela 2. Funções dos biossurfactantes e seus respectivos campos de aplicação.....	16
Tabela 3. Produção agrícola no Brasil obtida no decênio 2003-2012.....	24
Tabela 4. Equipamentos e reagentes utilizados.....	26
Tabela 5. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com 1% de glicose.....	32
Tabela 6. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com 3% de glicose.....	34
Tabela 7. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com 5% de glicose.....	36
Tabela 8. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante com 1% de glicose.....	38
Tabela 9. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante com 3% de glicose.....	39
Tabela 10. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante com 5% de glicose.....	39
Tabela 11. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com 1% de glicose.....	40
Tabela 12. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com 3% de glicose.....	41
Tabela 13. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com 5% de glicose.....	41
Tabela 14. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 3% de glicerol.....	42
Tabela 15. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 5% de glicerol.....	44
Tabela 16. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 10% de glicerol.....	45
Tabela 17. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com substrato enriquecido com 3% de glicerol.....	46
Tabela 18. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com substrato enriquecido com 5% de glicerol.....	47
Tabela 19. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com substrato enriquecido com 10% de glicerol.....	48

Tabela 20. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com substrato enriquecido com 3% de glicerol.....	48
Tabela 21. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com substrato enriquecido com 5% de glicerol.....	49
Tabela 22. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com substrato enriquecido com 10% de glicerol.....	49
Tabela 23. Valores de tensão superficial da amostra inicial e da amostra após fermentação para testes de estabilidade frente à temperatura.....	50
Tabela 24. Valores de tensão superficial da amostra inicial e da amostra após fermentação para testes de estabilidade frente à força iônica.....	52
Tabela 25. Valores de tensão superficial da amostra inicial e da amostra após fermentação para testes de estabilidade frente à alteração do pH.....	53
Tabela 26. Análise da tensão superficial após adição de soluções com diferentes pHs, na proporção de 1:1.....	54
Tabela 27. Análise da tensão superficial após adição de soluções com diferentes pHs, na proporção de 1:2.....	54
Tabela A 1. Dados de tensão superficial.....	67
Tabela A 2. Dados de índice de emulsão.....	67
Tabela B 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo.....	68
Tabela B 2. Dados de tensão superficial.....	68
Tabela B 3. Dados de índice de emulsão.....	68
Tabela C 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo.....	69
Tabela C 2. Dados de tensão superficial.....	69
Tabela C 3. Dados de índice de emulsão.....	69
Tabela D 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo.....	70
Tabela D 2. Dados de tensão superficial.....	70
Tabela D 3. Dados de índice de emulsão.....	70
Tabela E 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo.....	71
Tabela E 2 . Dados de tensão superficial.....	71
Tabela E 3. Dados de índice de emulsão.....	71

Tabela F 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo.....	72
Tabela F 2. Dados de tensão superficial.....	72
Tabela F 3. Dados de índice de emulsão.....	72

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, constituídas por duas partes sendo uma hidrofóbica e a outra hidrofílica, onde a porção apolar é, frequentemente, uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica. Tal característica permite que essas moléculas atuem como agentes de superfície, reduzindo a tensão superficial e interfacial de duas fases fluidas imiscíveis (Nitschke e Pastore, 2002).

Biossurfactantes são grupos de compostos químicos produzidos por microrganismos (bactérias, fungos ou leveduras), que também possuem característica anfipática, agindo como emulsificadores de hidrocarbonetos. Assim como os surfactantes, são polímeros que formam micelas que se acumulam na interface entre líquidos de diferentes graus de polaridade.

Outra propriedade importante apresentada pelos surfactantes e biossurfactantes é capacidade de formar agregados denominados micelas. Essas micelas se formam em baixas concentrações de água e há uma concentração mínima necessária para o início de sua formação, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC) (Barros *et al.*, 2007)

Tais características conferem aos biossurfactantes uma propriedades como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Kosaric, 1992).

Os surfactantes são amplamente utilizados em diversos ramos industriais e nas últimas décadas houve um grande aumento de sua demanda, principalmente dentro da indústria química.

Os biossurfactantes passaram a ganhar maior atenção e se tornaram uma alternativa interessante em substituição aos surfactantes sintéticos por apresentarem algumas vantagens em relação aos surfactantes, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e possibilidade de serem produzidos com a utilização de matérias-primas renováveis, de baixo custo (Nitschke e Pastore, 2006). A vasta aplicação destes compostos e suas propriedades são muito interessantes. Dentre os inúmeros biossurfactantes existentes e estudados, destaque-se os da classe dos lipopeptídios, usualmente produzidos por *Bacillus* (Ghodjavand *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes, de modo geral, podem ser classificados de acordo com sua origem microbiana em: glicolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, fosfolipídios e ácidos graxos/lipídio neutro, além de surfactantes poliméricos e articulados, sendo os lipopeptídios os biossurfactantes mais efetivos (Barros *et al.*, 2007).

Os surfactantes lipoproteicos são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo mais bem caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus sp*, incluindo a surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina (Barros et al., 2007). A surfactina é reconhecida como um dos biossurfactantes mais eficaz disponíveis, mas o alto custo e o baixo rendimento envolvidos na produção limitaram seu uso e aplicações. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias de alto rendimento e baixo custo de produção é de demanda urgente (Yeh et al., 2006).

As propriedades dos surfactantes naturais, aliadas às vantagens por eles apresentadas e a capacidade de se produzir diferentes biossurfactantes a partir de diferentes microrganismos permite que tais compostos tenham ampla aplicabilidade, das quais podemos citar: no processo de biorremediação, na recuperação melhorada do petróleo, na medicina como agentes antivirais, antitumorais e antimicrobianos, na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos e na nanotecnologia, como agentes de superfície na dispersão de nanotubos de carbono (Faria, 2010).

Atualmente, os altos custos de produção anteriormente citados resultantes de uma metodologia ineficiente do bioprocessamento, da baixa produtividade das cepas microbianas e da necessidade do uso de substratos de custo elevado, fazem com que os biossurfactantes não consigam competir, do ponto de vista econômico, no mercado com os surfactantes sintéticos (Haba *et al.*, 2000). Dentre estes fatores limitantes, estima-se que os substratos representem cerca de 30% do custo total da maioria dos processos biotecnológicos (Muthusamy et al., 2008).

Desta forma, a utilização de substratos de baixo valor econômico é uma forma de se reduzir o custo final de produção de metabólitos microbianos. Uma alternativa que vem sendo pesquisada extensivamente nos últimos anos é a utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de diversos compostos de origem microbiana, como os biossurfactantes. Resíduos ricos em carboidratos ou lipídios, com adequada relação carbono/nitrogênio e que apresentem altas concentrações de micronutrientes importantes para o metabolismo microbiano, como também para produção de biossurfactantes (Barros *et al.*, 2008).

A produção dos surfactantes biológicos é influenciada por diversos fatores, como a natureza das fontes de carbono e nitrogênio, a presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, a quantidade e qualidade do biossurfactante produzido também estão diretamente relacionadas à fatores como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo (Banat, 1995).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir biossurfactante através da fermentação do resíduo do processamento do abacaxi pela bactéria *Bacillus subtilis*, avaliando a viabilidade de tal processo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência do glicerol como fonte adicional de carbono para a produção de biossurfactante;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido quando exposto à altas temperaturas, frente à variação do pH e à força iônica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactantes e Biossurfactantes

Os surfactantes fazem parte de uma importante classe de produtos químicos amplamente utilizados em diversos ramos industriais. São moléculas anfipáticas, constituídas por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, onde a porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica. Essa característica anfifílica permite que tais substâncias possuam grande ação superficial, ou seja, elas tendem a se distribuir nas interfaces de duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade (Nitschke e Pastore, 2002).

Outra característica dos surfactantes é a tendência de formar agregados denominados micelas que, geralmente, se formam em baixas concentrações de água. Há uma concentração mínima, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC), na qual se inicia a formação de micelas, sendo esta uma importante propriedade dos surfactantes, tornando-os adequados para uma ampla gama de aplicações industriais, das quais podemos citar: emulsificação, detergentes, lubrificação, capacidades molhante e espumante, dispersão de fases e solubilização (Barros *et al.*, 2007).

A grande maioria dos surfactantes comerciais é sintetizada a partir de derivados de petróleo e são largamente utilizados na indústria petrolífera para auxiliar a limpeza em casos de derramamentos e para melhorar o processo de recuperação de óleos em reservatórios (Kronemberger, 2007).

Segundo Desai e Banat (1997), o mercado mundial de surfactantes atingiu, em 1997, cerca de 9,4 milhões de dólares, com uma tendência de crescimento de superior a 35% . Uma década depois, a produção mundial de surfactantes excedeu 3 milhões de t/ ano, concentrando a utilização nas indústrias de petróleo, de cosméticos, de produtos de higiene e de limpeza (Barros *et al.*, 2007). Contudo, houve um aumento na procura por surfactantes naturais devido ao crescimento da preocupação ambiental e com as novas legislações de controle do meio ambiente que entraram em vigor (Nitschke, 2002). Com isso a utilização de biossurfactantes, tensoativos de origem microbiana, tornou-se uma alternativa bastante viável, em comparação aos surfactantes

sintéticos. Os surfactantes naturais, além de apresentarem propriedades emulsificantes equivalentes aos sintéticos, possuem maior diversidade e possibilidade de utilização de substratos renováveis para sua produção em meio fermentativo (Kronemberger, 2007).

Atualmente, 70-75% dos surfactantes consumidos por países industrializados são de origem petroquímica, enquanto nos países em desenvolvimento há um predomínio de compostos de origem natural. Contudo, há uma tendência de substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais nos países industrializados devido a necessidade de produtos mais brandos, a necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis e o aumento da especificidade dos produtos (Nitschke, 2002).

Biossurfactantes são grupos de compostos químicos produzidos por bactérias, fungos ou leveduras, que também possuem característica anfipática, agindo como emulsificadores de hidrocarbonetos. Assim como os surfactantes, são polímeros que formam micelas que se acumulam na interface entre líquidos de diferentes graus de polaridade, conforme Figura 1.

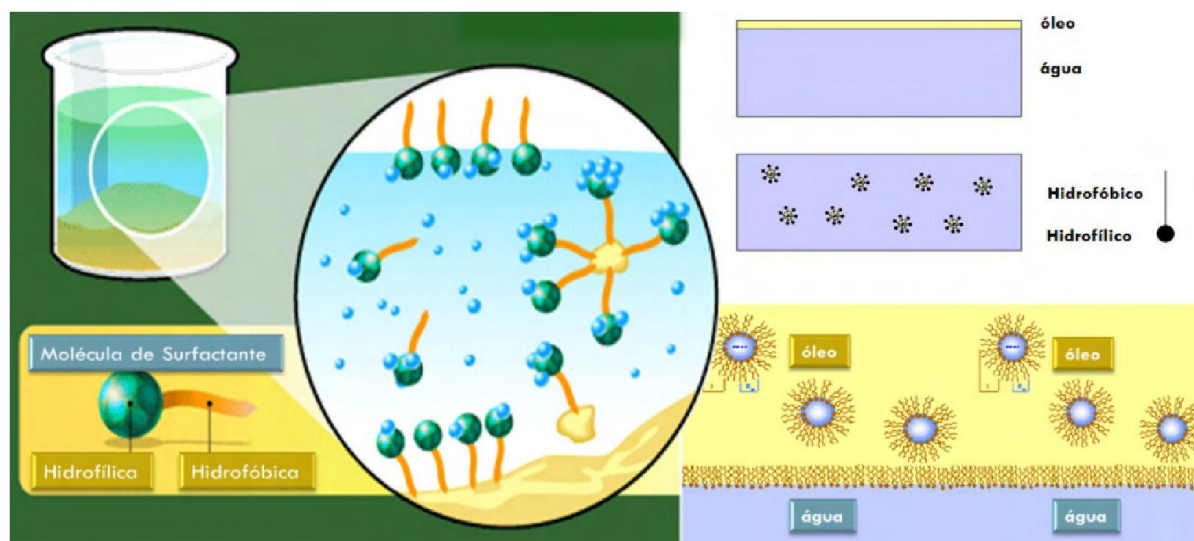


Figura 1. Estrutura dos biossurfactantes e produção de micelas (Montagnolli, 2011).

De maneira geral, os microorganismos são capazes de produzir vários produtos com excelentes propriedades tensoativas. Há uma tendência a se realizar trabalhos voltados a identificação de potenciais surfactantes, na avaliação de suas propriedades e na otimização dos processos fermentativos para sua produção, uma vez que o seu uso em determinadas aplicações depende do custo de produção e purificação para atividades específicas. (Kronemberger, 2007).

Vários são os fatores que afetam a produção dos biossurfactantes, como natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como a presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (Banat, 1995).

Em particular, o agente mais adequado para determinada aplicação pode ser adaptado através da escolha do microrganismo produtor, bem como a composição do meio nutriente e as condições de cultivo (Fernandes *et al.*, 2007). Tal aspecto, além de ampliar a variedade de biossurfactantes existentes, permite ainda a possibilidade de adequar o biossurfactante para uma atividade específica.

Dentre os microrganismos produtores, as bactérias são as maiores responsáveis pela produção de biossurfactantes. A presença de espumas e emulsões em áreas de derramamento de óleo em oceanos são evidências de que os surfactantes biológicos são produzidos, em alguns casos, em grande quantidade nesses ambientes. Desta forma, inúmeros são os estudos voltados para o isolamento de bactérias presentes no solo, nas águas marinhas, nos sedimentos dos mares e áreas contaminadas com óleos (Barros *et al.*, 2007).

Nos últimos anos muitos são os trabalhos com ênfase na busca por modificações das condições fisiológicas e da composição do meio de cultivo como alternativas para viabilizar a produção e uso de biossurfactantes (Castiglioni *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949, quando Jarvis e Johnson detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um ramnolipídio. Posteriormente a isso, em 1968, Arima *et al.* descobriram um novo composto biologicamente ativo, com alta atividade superficial produzido por *Bacillus subtilis*, a qual deram o nome de surfactina.

Mas foi só a partir da década de 80 (Barros *et al.*, 2007) que os biossurfactantes ganharam maior atenção por apresentarem algumas vantagens em relação aos surfactantes, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e possibilidade de serem produzidos com a utilização de matérias-primas renováveis, de baixo custo (Nitschke, 2006). Ademais, vantagens como estabilidade frente à temperatura, pH e força iônica, tornaram os biossurfactantes atrativos para o uso industrial, além da possibilidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou métodos microbiológicos (Lima, 2012).

Atualmente, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir economicamente no mercado com os compostos sintetizados quimicamente, devido aos altos custos de produção. Isso é resultado da metodologia ineficiente do bioprocessamento, da baixa produtividade das cepas microbianas e da necessidade do uso de substratos de custo elevado. (Haba *et al.*., 2000). Estima-se que os substratos representem de 10 a 30% do custo total da maioria dos processos biotecnológicos (Muthusamy *et al.*, 2008).

A utilização de substratos de baixo valor econômico é uma forma de se reduzir o custo final de produção de metabólitos microbianos. Uma alternativa que vem sendo pesquisada extensivamente nos últimos anos é a utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de diversos compostos de origem microbiana, como os biossurfactantes. Resíduos ricos em carboidratos ou lipídeos, com adequada relação carbono/nitrogênio e que apresentem altas concentrações de micronutrientes importantes para o metabolismo microbiano são os que se caracterizam como melhores substratos para o crescimento microbiano, como também para a produção de biossurfactantes (Barros *et al.*, 2008).

Segundo Desai e Banat (1997) o desenvolvimento de novas condições de fermentação podem resultar em um aumento da produtividade de biossurfactantes, o que inclui, além de substratos alternativos, equipamentos e métodos de extração.

Muitos trabalhos estão voltados, portanto, na otimização das condições de cultivo, que consiste nas melhores combinações de fatores essenciais ao desenvolvimento do microrganismo, como proporção e tempo de incubação do inóculo, temperatura, agitação ou a combinação desses fatores (Mano, 2008).

2.1.1 Classificação dos Biossurfactantes

A grande diversidade de biossurfactantes está atribuída ao fato de que cada microrganismo é capaz de produzir um surfactante diferente com características específicas. Desta forma o tipo, quantidade e qualidade de biossurfactante varia de acordo com o microrganismo produtor, com a natureza do substrato disponível, com a concentração de íons com nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio e demais condições de cultura, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (Banat, 1995).

A ampla variedade de biossurfactantes conhecidos é, portanto, classificada de acordo com sua origem microbiana e estrutura química (Faria, 2010), diferentemente dos surfactantes sintéticos que são classificados de acordo com a natureza de seus grupos polares (Kronemberger, 2007). Os biossurfactantes, de modo geral, podem ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeo neutro, além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Barros *et al.*, 2007).

A tabela 1 apresenta os principais biossurfactantes produzidos, sua origem microbiana e classificação.

Os lipopeptídeos e lipoproteicos são considerados como os biossurfactantes mais efetivos e talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo mais bem caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus sp*, incluindo surfactina (Barros *et al.*, 2007). São moléculas formadas pela ligação de um grupo proteico a uma cadeia de ácidos graxos (Faria, 2010).

O lipopeptídeo cíclico surfactina, produzido por *Bacillus subtilis*, possui uma potente atividade como biossurfactante. Estudos apontam uma capacidade de redução de tensão superficial de 72 à 27,9 mN.m⁻¹ (Faria, 2010). Desta forma, a surfactina é reconhecida como um dos biossurfactante mais eficaz disponíveis, mas o alto custo e o baixo rendimento envolvidos na produção limitaram suas aplicações. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias de alto rendimento e baixo custo de produção da surfactina é de demanda urgente (Yeh *et al.*, 2006).

Há também uma categorização de biossurfactantes de acordo com seu peso molecular. Surfactantes naturais de baixo peso molecular são, geralmente, glicolipídios ou lipopeptídios. Os biossurfactantes de alto peso molecular englobam os polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou uma mistura complexa desses polímeros (Faria, 2010).

Tabela 1. Classificação dos biossurfactantes de acordo com o microrganismo produtor

TIPO DE BIOSSURFACTANTE	MICRORGANISMO
Glicolipídios	
• ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
• soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
• trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e Lipoproteínas	
• peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
• viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
• serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
• surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
• subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
• gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
• polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos Graxos, Lipídios Neutros e Fosfolipídios	
• ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
• lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
• fosfolipídios	<i>Thiobacillus tiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	
• emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
• biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
• liposan	<i>Candida lipolytica</i>
• carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
• manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes Particulados	
• vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
• células	Várias bactérias

Fonte: Desai e Banat, 1997.

Algumas estruturas químicas dos biossurfactantes descritos, podem ser observadas na Figura 2. Tais estruturas comprovam o fato de que cada microrganismo produz um surfactante com características diferentes.

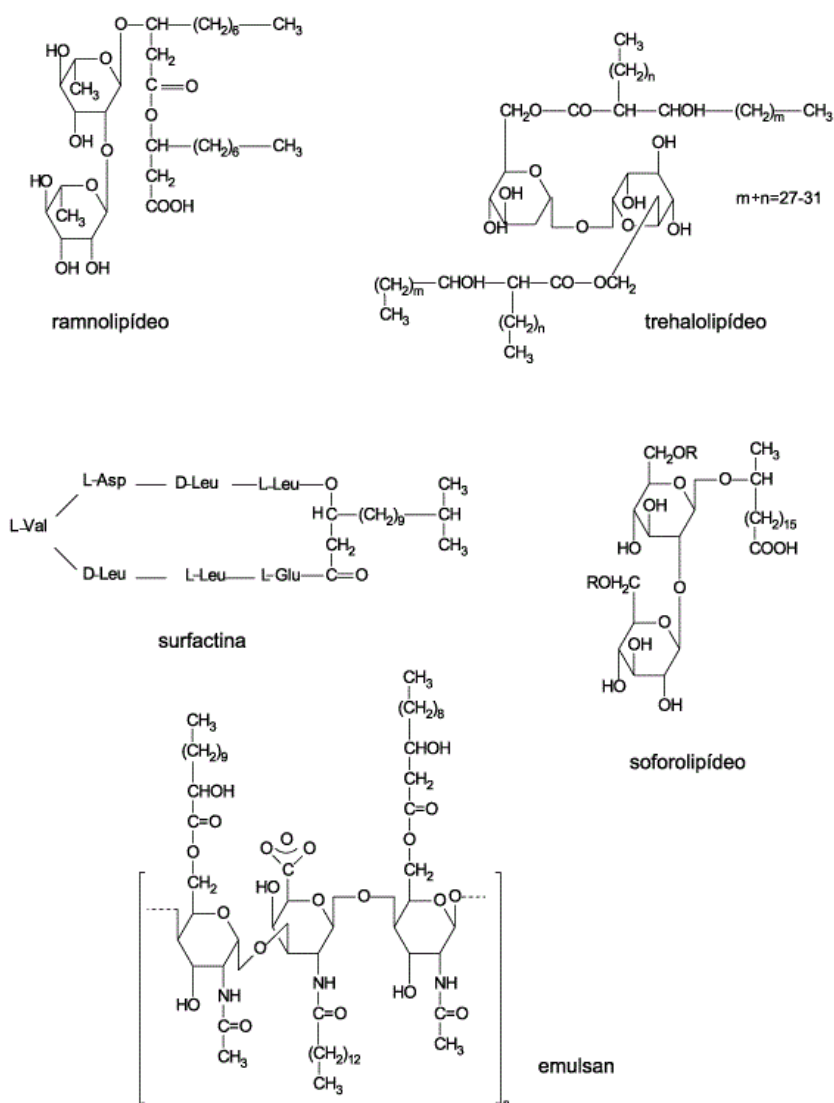


Figura 2. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes (Nitschke e Pastore, 2002).

2.1.2 Função Fisiológica dos Biossurfactantes

Diversas funções têm sido atribuídas aos surfactantes biológicos ao longo dos últimos anos e muitos justificam que tais funções estão baseadas nas propriedades físico-químicas que as

moléculas de biossurfactantes possuem. Sendo assim, hipóteses são levantadas a respeito dessas propriedades (Faria, 2010).

A primeira hipótese estuda que o crescimento de microrganismos é facilitado através da redução da tensão superficial (Mulligan e Gibbs, 1993), bem como pela capacidade de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, com excessão das cepas de *Bacillus subtilis* que produzem surfactantes em substratos hidrossolúveis (Nitschke e Pastore, 2002).

Uma segunda hipótese está relacionada a capacidade de transporte de hidrocarbonetos e adesão de microrganismos a superfícies, uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos (Nitschke e Pastore, 2002), na qual ocorre a formação de um biofilme em um nicho ecológico garantindo a possibilidade de multiplicação do microrganismo (Rosenberg e Ron, 1999). As estruturas da superfície celular são as responsáveis por essa aderência e os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades de superfície celular, buscando aderir ou liberar-se de um determinado local, visando sua necessidade de buscar ambientes com melhores condições nutricionais para o seu desenvolvimento, ou se livrar de ambientes desfavoráveis (Rosenberg e Ron, 1999).

Por fim, a última hipótese está vinculada a atividade antibiótica apresentada por diversos biossurfactantes, principalmente lipopeptídios e glicolipídios. Tal atividade baseia-se na solubilização dos principais componentes das membranas celulares microbianas, o que pode estar diretamente combinado às suas propriedades anfipáticas (Lin, 1996).

2.1.3 Propriedades dos biossurfactantes

Ainda que os biossurfactantes apresentem inúmeras propriedades e diferentes composições químicas, algumas características, as quais proporcionam vantagens aos surfactantes naturais quando comparados aos sintéticos, são comuns à grande parte deles (Bognolo, 1999).

A alta capacidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial e interfacial é talvez a propriedade mais explorada e, apesar dos surfactantes sintéticos serem bastante efetivos nesse aspecto, os biológicos possuem a vantagem de reduzir a tensão com menores concentrações de biossurfactantes (Bognolo, 1999).

A alta atividade tensoativa atribui aos biossurfactantes importantes propriedades, como emulsificação, detergência, lubrificação, solubilização, capacidade espumante e molhante e dispersão de fases (Kosaric, 1992).

A tolerância à temperatura, pH e força iônica apresentada pelos biossurfactantes também os coloca à frente dos surfactantes sintéticos. Alguns biossurfactantes possuem elevada estabilidade quando expostos à altas temperaturas, soluções com diferentes valores de pH ou em altas concentração salinas, permitindo a utilização desses compostos em ambientes com condições mais drásticas (Nitschke e Pastore, 2002).

A biodegradabilidade e a baixa toxicidade são propriedades comuns a maioria dos surfactantes naturais que possuem grande destaque, devido ao aumento das preocupações ecológicas e para atender as novas legislações sobre este aspecto.

Os biossurfactantes são facilmente degradáveis em água e solo, propriedade não observada nos surfactantes sintéticos. Tal característica, amplia sua aplicabilidade, sendo possível a utilização destes compostos em processos como a biorremediação e tratamento de resíduos (Mulligan e Gibbs, 1993).

Por fim, a baixa toxicidade apresentada pelos biossurfactantes torna-os adequados para utilização nas indústrias de alimentos, produtos cosméticos e farmacêuticos.

2.2 Produção de Biossurfactantes

A síntese dos biossurfactantes ocorre especialmente durante o crescimento microbiano em substratos imiscíveis em água (Castiglioni *et al.*, 2009). Embora exista uma maior número de estudos sobre essa síntese por microrganismos que degradam hidrocarbonetos, alguns biossurfactantes podem ser obtidos através de compostos solúveis em água (Kronemberger, 2007). A produção dos surfactantes naturais está associada a diversos fatores impostos no processo produtivo, fatores esses determinantes na quantidade e qualidade de biossurfactante produzido.

Modificações nas condições fisiológicas e na composição do meio de cultivo são alternativas promissoras para o aumento da produtividade dos biossurfactantes e vêm sendo estudadas com mais frequência nos últimos anos (Castiglioni *et al.*, 2009).

São diversos os métodos envolvidos na produção de biossurfactantes, a começar pela grande variedade de metodologia aplicada para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes. Tais métodos podem ser quantitativos ou qualitativos, sendo a maioria baseado nas propriedades físico-químicas dos surfactantes, principalmente em sua atividade de superfície (Faria, 2010).

A produção de agentes de superfície ocorre, geralmente, no meio de cultura apropriado ou aderido às paredes celulares. A busca por microrganismos produtores está relacionada com o potencial dos mesmos em reduzir a tensão superficial, na sua capacidade de formar emulsão e capacidade estabilizante, sendo esses os fatores avaliados pelas indústrias na escolha do microrganismo a ser utilizado (Pinto *et al.*, 2009).

A qualidade e quantidade de biossurfactante produzido está intimamente relacionada à natureza das fontes de carbono e de nitrogênio oferecidas ao microrganismo produtor, condições do meio de produção como pH, temperatura, agitação e oxigenação, bem como a presença e concentração de nutrientes como o fósforo, ferro, manganês e magnésio presentes no substrato (Lin, 1996).

A produção ainda pode ser induzida por substratos imiscíveis ou solúveis em água, dependendo do microrganismo produtor (Faria, 2010).

Uma produção de biossurfactantes com êxito irá depender da obtenção de um substrato de baixo custo com uma composição química adequada que permita o crescimento celular e a produção de metabólitos secundários de interesse (Antunes, 2013).

Há ainda a possibilidade de aplicação da engenharia genética com cepas produtoras para melhorar o desempenho de produtividade e rendimento. Um maior conhecimento de rotas metabólicas de produção possibilitam que os genes que codificam as enzimas envolvidas sejam expressos em hospedeiros para permitir a utilização de substratos mais baratos, além de substituir produtores patôgenos (Kronemberger, 2007).

2.2.1 Avaliação da efetividade do biossurfactante produzido

A efetividade de produção de biossurfactante pode ser avaliada, principalmente, por sua capacidade de redução da tensão superficial. Como anteriormente descrito, os biossurfactantes

são agentes ativos de superfície, com amplo espectro de propriedades físico-químicas, as quais inclui, além da capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, baixos valores de concentração micelar crítica (CMC) e alta capacidade emulsificante (Faria, 2010).

A tensão superficial pode ser medida facilmente através de um tensiômetro, porém diferentes técnicas estão sendo desenvolvidas e validadas para acompanhar a redução da tensão superficial durante a produção de biossurfactantes. A tensão superficial da água, por exemplo, é de, aproximadamente, 72 mN/m, mas adição de surfactantes pode reduzir esse valor para até 30 mN/m (Kronemnerg, 2007).

Mulligan (2005) descreve tensão superficial como a medida da energia livre por unidade de área requerida para trazer uma molécula da fase principal para a superfície. A presença do surfactante reduz a energia necessária para trazer a molécula para a superfície e, conseqüentemente, a tensão superficial é reduzida também.

A concentração micelar crítica (CMC), fator de avaliação da efetividade do biossurfactante, é definida como a concentração mínima necessária para a formação dos agregados, denominados micelas. A partir do início do processo de formação das micelas, a tensão superficial se mantém constante, ou apresentará pequenas alterações (Faria, 2010). Biossurfactantes eficientes são aqueles com baixos valores de CMC, ou seja, os que em baixas concentrações são capazes de reduzir a tensão superficial (Mulligan e Gibbs, 1993).

A avaliação da eficácia do biossurfactante produzido também pode ser verificada pela sua capacidade de emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água, através do aumento significativo da degradação desses hidrocarbonetos (Castiglioni *et al.*, 2009), bem como através de sua atividade na estabilização ou desestabilização de emulsões (Kronemberger, 2007).

2.3 Aplicações dos Biossurfactantes

Como já mencionado, em função da presença de porções hidrofóbicas e hidrofílicas, os biossurfactantes são capazes de se distribuir na interface de líquidos imiscíveis. Ocorre, então, a formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, que promove a redução da tensão superficial e interfacial, garantindo as propriedades dos surfactantes. Tais propriedades tornam essas moléculas aplicáveis em diferentes áreas industriais (Nitschke e Pastore, 2002).

Os biossurfactantes estão se tornando cada vez mais importantes tanto na aplicação industrial, quanto medicinal, devido seu modo de ação específico, facilidade de preparação, aplicabilidade generalizada e vantagens em relação aos sintéticos (Sen, 2010).

Pela sua ampla diversidade química com propriedades e aplicações específicas, podemos destacar a utilização dos biossurfactantes na biorremediação, recuperação melhorada do petróleo, aplicações na medicina como agentes antivirais, antitumorais e antimicrobianos, na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos e na nanotecnologia, como agentes de superfície na dispersão de nanotubos de carbono (Faria, 2010). Eles também apresentam papéis fisiológicos naturais com o aumento da biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas e podem interagir com metais pesados, contribuindo para uma melhora na degradação de contaminantes químicos (Sen, 2010).

O maior mercado para os biossurfactantes, contudo, é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou também inseridos nas formulações de óleos lubrificantes (Van Dyke et al., 1991).

A tabela 2 apresenta as principais aplicações comerciais dos biossurfactantes, comprovando o vasto espectro de utilização desses compostos.

Tabela 2. Funções dos biossurfactantes e seus respectivos campos de aplicação

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de Viscosidade	Transporte de tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatogênicos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

2.3.1 Biorremediação

A contaminação do solo ou oceanos por óleo é um problema comum, cujo os métodos de tratamento físico mais utilizados, ou técnicas de remediação, são muitas vezes difíceis ou economicamente inviáveis (Sen, 2010).

O processo de biorremediação é uma nova tecnologia na qual, através do uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes, é possível o tratamento de locais contaminados (Bento *et al.*, 2003). Uma alternativa viável, do ponto de vista econômico, que

baseia-se na destruição parcial ou completa da estrutura molecular dos diluentes ambientais, através da utilização de microrganismos (Sen, 2010).

O aumento da interação superficial água/óleo gerado pelos biossurfactantes resulta em uma aceleração na degradação de diferentes óleos e promovem a biorremediação de água e solos contaminados em acidentes com derramamento de óleo, bastante numerosos nos últimos anos e preocupantes do ponto de vista ecológico e social (Nitschke e Pastore, 2002).

A biorremediação, portanto, consiste na realização de tratamentos biológicos para reduzir a concentração dos contaminantes derramados no ambiente à níveis ambientalmente aceitáveis (Faria, 2010).

Não apenas os acidentes com navios petroleiros são os responsáveis pelo derramamento de óleos nos oceanos e sua consequente poluição. Tais acidentes correspondem apenas à uma pequena parcela dos hidrocarbonetos presentes na marinha, sendo as maiores fontes provenientes de lavagens de navios, atividades na exploração do petróleo, efluentes urbanos e industriais, além de vazamentos naturais de óleo no fundo dos oceanos (Marques, 2009).

A biodegradação é um dos métodos mais eficientes para a remoção dos poluentes, e a capacidades dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação desses compostos no ambiente (Nitschke e Pastore, 2002).

Estudos feitos por Rahma *et al.* (1990) apresentaram degradação de 83-98% de hidrocarbonetos na biorremediação de n-alcanos em lodo de petróleo, através da adição de biossurfactantes do tipo ramnoliípidios, indicando o efeito benéfico desses compostos em baixas solubilidades.

Outro trabalho envolvendo a biorremediação foi apresentado por Urum *et al.* (2004) que examinaram a remoção do petróleo em solo contaminado através da adição de ramnolipídios em comparação a remoção com adição de surfactante sintético. Ambos apresentaram resultados de remoção com níveis semelhantes, portanto os autores consideraram o uso do biossurfactante mais adequado pois apresentou a mesma eficácia do surfactante químico e ainda apresenta vantagens referentes à baixa toxicidade e biodegradabilidade, favoráveis ao meio ambiente.

Outro estudo, bastante revelante, foi o apresentado por Mukherjee *et al.* (2006) que demonstraram a eficácia de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* na biodegradação de óleo de petróleo em solo contaminado no Nordeste da Índia e ainda ressaltaram que, além de

eficazes na solubilização de hidrocarbonetos de petróleo, há a vantagem de um fornecimento contínuo de surfactantes naturais, não tóxicos, biodegradáveis e de baixo custo.

2.3.2 Indústrias de Alimentos

Nos últimos anos aumentou-se a exigência dos consumidores por produtos alimentícios produzidos com ingredientes e aditivos naturais, aumentando, assim, a demanda das indústrias de alimentos em busca de alternativas para reduzir o uso de aditivos sintéticos (Faria, 2010).

Nas indústrias alimentícias, os biossurfactantes possuem grande aplicabilidade como agentes emulsionantes no processamento de matéria-prima, conferindo a formação da consistência e textura dos alimentos, bem como na dispersão de fases (Banat *et al.*, 2000). Também influenciam as características reológicas da farinha no processo de panificação e a emulsificação de gorduras na produção de derivados de carne (Nitschke e Pastore, 2002).

São aplicáveis também no processo de controle de aglomeração de glóbulos de gorduras, além de serem utilizados para estabilizar sistemas gaseificados. Nas padarias e fábricas de sorvetes atuam como controladores de consistência e solubilizantes de óleos aromatizantes (Nitschke e Costa, 2007).

Estudos feitos por Shepherd *et al.* (1995), confirmaram que bioemulsificadores produzidos por *Candida utilis* apresentaram uma ação emulsificante mais efetiva do que produtos sintéticos comumente utilizados nas indústrias de alimentos, como a carboximetilcelulose, por exemplo.

Além da aplicabilidade na produção de alimentos, as indústrias alimentícias podem aproveitar seus subprodutos ou resíduos como substratos para a própria produção de biossurfactantes, uma abordagem bastante interessante (Makkar e Cameotra, 2002).

2.3.3 Aplicações Terapêuticas

As propriedades físico-químicas e biológicas, a boa compatibilidade com a pele, juntamente com a aceitabilidade ecológica, tornaram os biossurfactantes bastante interessantes no mercado farmacêutico, cosmético e terapêutico.

A surfactina, um dos mais conhecidos surfactantes naturais produzido por *Bacillus subtilis*, possui um vasto espectro de aplicação farmacêutica, das quais podemos citar a

capacidade de inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas (Banat *et al.*, 2000), além de atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiviral (Nitscke e Pastore, 2002).

A potente aplicação dos biossurfactantes na área médica é uma alternativa apropriada em substituição a agentes terapêuticos e medicamentos sintéticos. As moléculas de biossurfactantes interagem com as moléculas de superfície celulares, desestruturando membranas através da emulsificação de lipídios, lipoproteínas e fosfolipídios. Ou ainda, as moléculas de surfactantes naturais podem interagir com superfícies sólidas e afetar a adesão de células microbianas (Faria, 2010).

Surfactantes naturais apresentam também grande potencial como detergentes, emulsificantes, solubilizantes, dispersantes e formadores de espumas, propriedades bastante úteis para o desenvolvimento de cosméticos e medicamentos.

2.4 Utilização de Substratos Renováveis

Embora os biossurfactantes possuam claras vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, associadas à equivalente atividade como agentes de superfície e emulsificantes, a produção de surfactantes biológicos em escala industrial ainda não é realizada devido aos altos custos e baixos rendimentos (Mukherjee *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, diversos estudos sobre produção de biossurfactantes com diferentes microrganismos têm sido reportados e, atualmente, há uma variedade de dados relacionados à produção, tipo e propriedades dos biossurfactantes. Ademais, muitas propostas são elucidadas afim de se encontrar a solução ideal para redução do custo de produção e, conseqüentemente, a viabilidade do uso de biossurfactantes industrialmente.

Segundo Mukherjee *et al.* (2006), atualmente, três vertentes têm sido adotadas para tornar esses processos mais competitivos:

- a. Uso de substratos renováveis e de baixo custo;
- b. Desenvolvimento de processos eficientes, incluindo a otimização de condições de cultivo, adoção de processos de separação e recuperação de baixo custo;
- c. Desenvolvimento e utilização de linhagens mutantes ou recombinantes, visando melhorar o rendimento da produção desses biossurfactantes.

Do ponto de vista econômico, a quantidade e o tipo de matéria-prima utilizada como substrato para o desenvolvimento do microrganismo é o fator mais preocupante no processo. Estima-se que cerca de 30% do custo total de produção está vinculado à obtenção de um substrato adequado para a produção de biossurfactantes (Cameotra e Makkar, 1998).

Desta maneira, o uso de substratos renováveis torna-se interessante para viabilizar essa produção. Uma possibilidade factível é a utilização de matérias-primas ou resíduos orgânicos provenientes das agroindústrias. Milhões de toneladas de resíduos são gerados a cada ano em todo o mundo, e no Brasil esse amplo setor agroindustrial garante uma enorme quantidade e variedade de rejeitos (Faria, 2010).

Dentre as matérias-primas renováveis utilizadas para a produção de biossurfactantes, podemos citar o uso de óleos vegetais, como reportado por Rahman *et al.* (2001) na produção de ramnolipídios através da utilização de óleo de soja e de girassol. O aproveitamento de resíduos provenientes de refinarias de extração de óleos vegetais também são bons substratos como estudado por Benincasa *et al.* (2004) para a produção de glicolipídios por *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resíduos oleosos são alternativas interessantes quando utilizados juntamente com microrganismos adaptados à oleosidade do meio. Os compostos oleosos são degradados pelos microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fontes de carbono para obtenção de energia. Estudos apontam que microrganismos ambientados à crescer em óleo são bons produtores de biossurfactantes (Decesaro *et al.*, 2013).

Diversos substratos renováveis foram adotados como alternativa viável para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Resíduos provenientes do processamento da mandioca, resíduos do processamento da batata, ambos ricos em carboidratos, e o melaço, resíduo agroindustrial, são alguns exemplos de eficazes fontes de nutrientes para o desenvolvimento do *bacillus* e produção de biossurfactantes em quantidade e qualidade aplicáveis às indústrias (Faria, 2010).

2.5 *Bacillus subtilis*

Diversas espécies de microrganismos tem sido estudadas e caracterizadas como produtores de agentes de superfície (Kushida, 2000). A produção tais agentes varia de acordo com o tipo de microrganismo, as leveduras e fungos filamentosos utilizam, preferencialmente, n-alcenos saturados, não ramificados. Já algumas bactérias degradam isoalcenos e isociclanos, assim como compostos insaturados e aromáticos (Kosaric *et al.*, 1987).

A bactéria *Bacillus subtilis* é um bacilo gram positivo de solo, não patogênico, não colonizador de tecidos, formador de esporos e naturalmente transformável, ou seja, a capacidade de capturar DNA exógeno faz parte do seu ciclo de vida (Paccez, 2007).

Os *Bacillus* são muito utilizados para a produção industrial de proteínas recombinantes. Tal fato se dá devido ao fato de que a cultura dessas bactérias em sistema de produção de larga escala a densidades elevadas é fácil e barato (Westers, 2004).

Considerada como uma das principais espécies de microrganismo para produção de biossurfactantes, os *Bacillus subtilis* foram, por muito tempo, considerados bactérias estritamente aeróbias, porém, estudos conduzidos nos últimos anos, mostraram que tal espécie pode também crescer em ambientes anaeróbicos (Andrade, 2011).

Conhecido como produtor de lipopeotídeos, o *Bacillus subtilis*, ganhou destaque pela sua facilidade em produção da surfactina, melhor lipopeptídeo caracterizado (Kushida, 2000).

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico conhecido como um dos biossurfactantes mais eficazes, podendo reduzir a tensão superficial de 72 para 27,9 mN/m e possuir uma CMC de 0,017g/l. (Sen, 2010). É formada por uma cadeia carbônica e um anel lactona composto de heptapeptídio, interligados a uma cadeia carbônica (Andrade, 2011).

Estudos recentes mostraram a efetividade da surfactina como antiviral, antitumoral, como anticoagulante e inibidora de enzima, porém, apesar de tais propriedades qualificá-la para potenciais aplicações na medicina ou biotecnologia, são poucos os estudos publicados até o momento explorando sua ação (Sen, 2010).

As variações no comprimento e conformação de sua cadeia lipídica, associada as substituições de aminoácidos em sua parte proteica, fazem com a surfactina possa ser encontrada em diferentes isoformas que se diferenciam em suas propriedades físico-químicas (Faria, 2010), garantindo assim uma extensa variabilidade de uso e aplicações de tal surfactante natural.

Quando compara à surfactantes sintéticos como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e o brometo de trimetil amônio (BTA) e até mesmo com outros biossurfactantes, a surfactina apresentar maior capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, além de possuir valores de concentração micelar crítica (CMC) inferiores. Além disso, a surfactina é capaz de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis em água garantindo uma maior aplicabilidade industrial (Barros *et al.*, 2007).

2.6 Abacaxi

O abacaxi é um pseudofruto da família Bromeliaceae que, apesar de fazer parte desta família cujo nome está intimamente associado à bromélias, sua espécie (*Ananas comosus*) é a mais conhecida, sendo inclusive considerado como uma das frutas tropicais mais populares do mundo, principalmente devido ao seu sabor e aroma marcantes (Coelho, 2012). O abacaxi é o único representante da família Bromeliaceae cultivado extensivamente como fonte de alimento (Manetti *et al.*, 2009).

Embora nativo da América do Sul é atualmente cultivado em regiões de clima tropical, subtropical e suave em todo o mundo devido à sua capacidade de adaptação, resistência à seca e facilidade de propagação. Cerca de 50% de sua produção mundial está concentrada no Brasil, Tailândia, Filipinas, Costa Rica e China (Rodríguez *et al.*, 2013).

Em 1997, a Tailândia foi considerado o país com maior produção de abacaxi mundial, seguindo pelo Brasil, como apresentado na Figura 3.

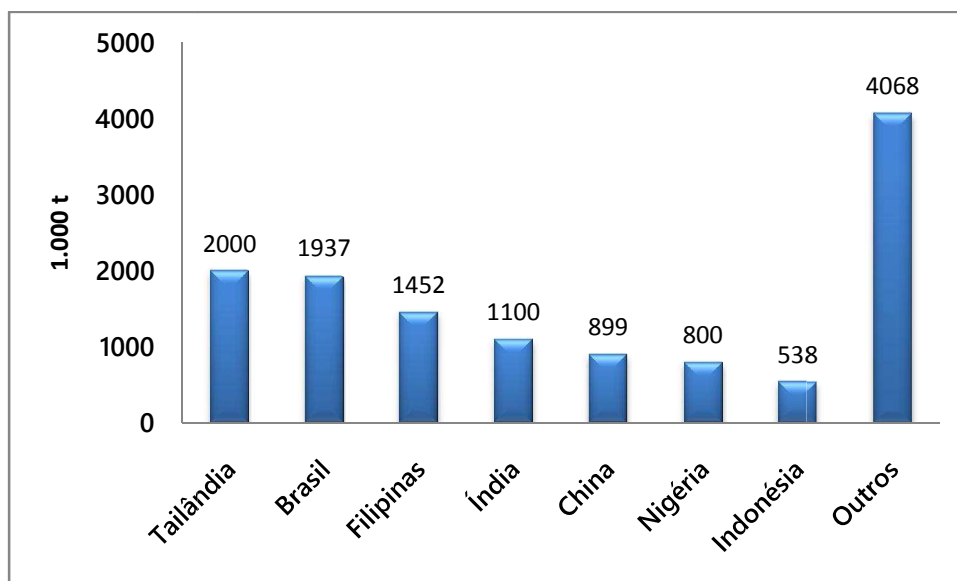


Figura 3. Principais países produtores de abacaxi em 1997 (Souza *et al.*, 1999)

Um estudo feito por Souza *et al.* (1999), comparou a produção de abacaxi entre os anos de 1979 a 1981 nos nove países considerados os maiores produtores mundiais do fruto. Tal comparação pode constatar que o Brasil foi o país com mais acréscimo de produção, cerca de 228,86%.

No Brasil, o abacaxi é explorado em mais de 72 mil hectares. Ocupando o quarto lugar no cultivo de frutas no país, a produção do abacaxizeiro possui grande importância no aspecto social, por gerar empregos e renda no meio rural. Além disso, sua importância econômica também é destaque no país, principalmente nos estados Pará, Paraíba, Minas Gerais e Bahia. Já no estado de Tocantins, o fruto é cultivado em todos os municípios, constituindo o terceiro PIB agrícola do estado (Matos *et al.*, 2009).

Dentre os estados citados acima, Minas Gerais e Paraíba se destacam como os maiores produtores de abacaxi no Brasil, sendo que as produções somadas representam mais da metade da produção brasileira (Morgado *et al.*, 2004).

Não só utilizado como alimento, mas também comumente empregado na medicina popular, o abacaxi apresenta reconhecidas propriedades medicinais, agindo como estomático, diurético e anti-inflamatório, além de ser utilizado também em problemas das vias respiratórias e para neurastenia (Manetti *et al.*, 2009).

Utilizado como matéria-prima em diversos ramos indústrias, o abacaxi tem seu maior destaque como suco. Diversos trabalhos publicados destacam o alto valor energético do suco do abacaxi, uma vez que o fruto apresenta em sua composição uma elevada concentração de açúcares, diferentes sais minerais como o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio e cobre, além de vitaminas A, C, B1, B2 e a Niacina. Apesar de todos esses componentes energéticos, o teor protéico e o teor de gordura, são inferiores à 0.5% (Lima *et al.*, 2010).

Nos processos industriais, os resíduos do abacaxi (casca, talo, coroa e folhas) são retirados e descartados antes do processamento e contabilizam cerca de 50% do peso total do abacaxi. Consequentemente, com o aumento da produção do abacaxi, aumenta-se também a quantidade de resíduo gerado.

Numericamente falando, um único hortifruti de Campinas -SP vende, aproximadamente, 350 abacaxis descascados por dia, gerando assim resíduo equivalente à 10.500 abacaxis em um mês. Tal resíduo é rico em carboidratos, caracterizando como um bom substrato para o desenvolvimento de microrganismos e, portanto, produção de biossurfactantes.

A tabela 3 apresenta a produção de abacaxi das safras de 2003 à 2012 no Brasil, evidenciando a grande quantidade do fruto produzida nos últimos anos no país.

Tabela 3. Produção Agrícola no Brasil obtida no decênio 2003 - 2012 (IBGE, 2013)

PRODUÇÃO OBTIDA (t)					
ABACAXI	2003	2004	2005	2006	2007
	1.440.013	1.447.299	1.528.313	1.707.088	1.784.215
ABACAXI	2008	2009	2010	2011	2012
	1.712.365	1.470.995	1.470.391	1.576.972	1.650.936

Segundo o IBGE 2013, os valores de produção de abacaxi no ano de 2013 chegou a 1.580.795 toneladas, sendo as regiões Nordeste e Sudeste com maiores índices de produção, como pode ser observado na figura 4.

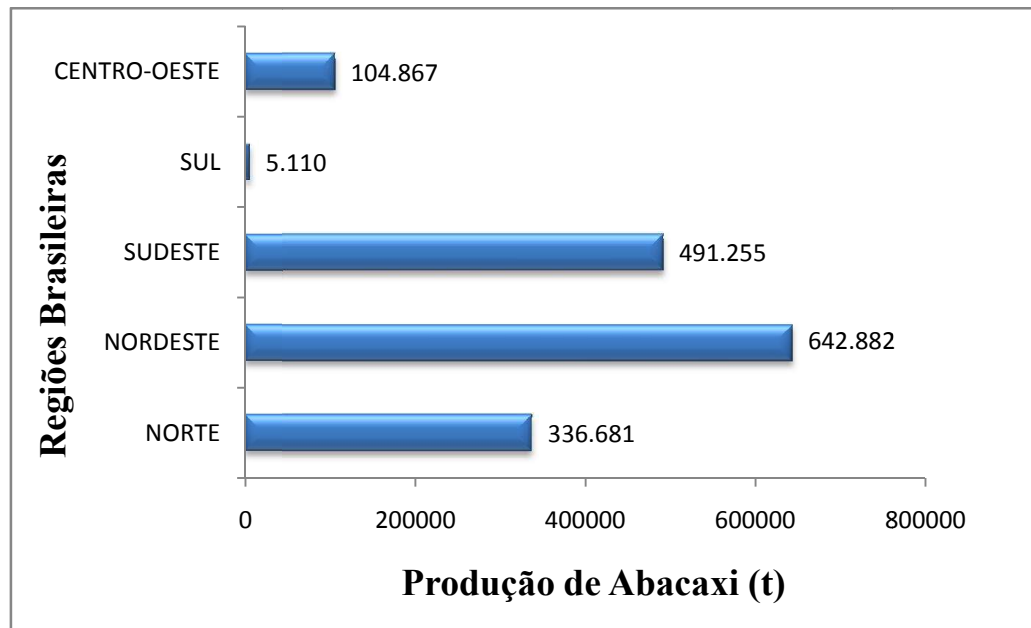


Figura 4. Levantamento sistemático por região da produção agrícola de abacaxi no Brasil (IBGE, 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foi utilizada cepa de *Bacillus subtilis* (CCT 2576), gentilmente cedidas pela Fundação André Tosello.

Os reagentes e equipamentos utilizados no presente trabalho estão identificados na tabela 3, com suas respectivas procedências.

Tabela 4. Equipamentos e reagentes utilizados

	Descrição	Marca
EQUIPAMENTOS	Agitador Vortex IA - MS 3	IKA
	Autoclave AB 25	PHOENIX
	Balança Analítica AUY220	Shimadzu
	Banho Maria DubNoff (Shaker)	Marconi
	Bico de Bunsen	-
	Centrífuga Refrigerada Velocity 14R	Dynamica
	Espectrofotômetro AJX-1900	Micronal
	Estufa 515	FANEM
	Incubadora	-
	pHmetro	Lutron
	Pipetador Automático	BRAND
	Processador FC-600	Fam
	Descrição	Marca
REAGENTES	Ácido Clorídrico P.A.	Synth
	Ágar Nutriente	ONIX
	Cloreto de Sódio P.A.	Synth
	D - Glicose Anidra	Synth
	Glicerina (Glicerol) P.A.	Vetec
	Hidróxido de Sódio P.A.	Synth
	Peptona	-

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo do Microrganismo

Para cultivo e preservação do *Bacillus subtilis*, foram realizados repiques mensais. A conservação do microrganismo é de grande valia pois previne contra contaminações, contra a perda da viabilidade e contra possíveis mutações.

3.2.1.1 Processo de Repique

Foram realizados 10 tubos de repique do *Bacillus subtilis*. Os tubos contendo ágar nutriente foram autoclavados por 15 minutos e deixados em repouso até esfriar. O repique foi então realizado com auxílio de alça de platina e bico de bunsen. Os tubos repicados foram incubados por 24 horas e mantidos refrigerados.

A figura 5 representa o processo de repique realizado.



Figura 5. Demonstrativo do processo de repique do microrganismo (Diaz, 2013).

3.2.1.2 Meio de cultura para conservação das cepas

Os *Bacillus* foram conservados por repiques mensais em tubos de ensaio contendo ágar nutriente sob refrigeração a 4 °C para diminuir o metabolismo celular e poderem ser utilizadas nas análises posteriores.

A figura 6 ilustra os tubos de conversação do microrganismo em ágar, pós repique.

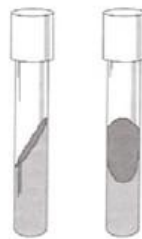


Figura 6. Tubos de repique contendo ágar nutriente (Diaz, 2013).

3.2.2 Produção do Biossurfactante

O processo de fermentação para produção de biossurfactante foi realizado com auxílio de um shaker, com agitação pré-fixada e mantendo a temperatura constante em 37°C.

3.2.2.1 Preparo do pré-inóculo

Para preparo do pré-inóculo, uma solução aquosa de 15 mL contendo peptona, cloreto de sódio e glicose foi preparada em um erlenmeyer de 125 mL, autoclavada e após resfriamento, inoculou-se a cultura com auxílio de alça de platina e bico de bulsen, em ambiente previamente esterilizado com álcool. O erlenmeyer foi colocado em shaker, com agitação constante e temperatura de 37 °C, durante 6 horas. Tal processo garantiu o crescimento e adaptação do *Bacillus subtilis* nas condições impostas.

Concomitantemente, preparou-se o inóculo com mais 100 mL da mesma solução aquosa contendo peptona, cloreto e glicose, em erlenmeyer de 250 mL e autoclavada. Após o período de 6 horas descrito, uma porção de 10 mL do pré-inóculo, já adaptado ao meio de crescimento, foi transferida para os 100 mL de solução e mantido em shaker, com agitação constante e temperatura de 37 °C, durante 14 horas, garantindo o desenvolvimento do microrganismo no meio.

A padronização do inóculo foi realizada utilizando 100 mL do mesmo meio nutriente ajustado em espectrofotômetro em uma faixa de absorbância de 0,08 a 0,1, em comprimento de onda de 625nm.

As concentrações de peptona e cloreto de sódio foram mantidas para todas as fermentações em 0,76 % e 0,06 %, respectivamente. As concentrações de glicose variaram a cada fermentação, em 1%, 3% e 5%, para comparação dos resultados de produção de biossurfactante.

3.2.2.2 Preparo do Substrato

Em seis frascos de 250 mL foram adicionados 80 mL de caldo do abacaxi, previamente esterilizados em autoclave à 120 °C, por 10 minutos.

3.2.2.3 Processo Fermentativo

As fermentações para a produção foram realizadas com os seis erlenmeyers de 250 mL, contendo o substrato anteriormente descrito. Em cada frasco foram acrescidos 8mL do inóculo (10 %) e devidamente fechados com tampas de gaze e algodão, revestidas por papel alumínio, para evitar contaminação. Foram, então, mantidos sob agitação constante, à 37 °C, por 24 horas. Neste período, foram retiradas 7 amostras, uma inicial (tempo zero), uma segunda após 1 hora de fermentação, as 4 seguintes em intervalos de 2 horas cada e uma última amostra após 24 horas de fermentação. A amostra do ponto inicial de fermentação retirada para análise foi utilizada como controle, ou seja, como ponto de comparação em relação as amostras retiradas durante o processo fermentativo. Tais amostras foram centrifugadas à 3.500 rpm por 10 minutos e submetidas à determinação de tensão superficial e índice de emulsificação.

Importante ressaltar que cada amostra foi retirada de um frasco diferente (com exceção da amostra tempo zero e da amostra após uma hora de fermentação), para evitar possíveis contaminações.

3.2.3 Enriquecimento com Glicerol

Após realização das três fermentações com diferentes concentrações de glicose, repetiu-se o mesmo processo fermentativo descrito anteriormente foi realizado, porém acrescentando glicerol comercial ao caldo de abacaxi para enriquecimento do substrato e posterior determinação

da tensão superficial e índice de emulsificação. Desta forma, foi possível avaliar e comparar o comportamento e produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em diferentes condições.

As concentrações de glicerol variaram a cada fermentação em 3%, 5% e 10%, desta vez mantendo a concentração de glicose em 5%.

3.2.4 Medida da Tensão Superficial

3.2.4.1 Método do Peso da Gota

A tensão superficial foi realizada seguindo a metodologia de Behring, 2004. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.2.5 Índice de Emulsão

A emulsificação foi medida através da proporção óleo/biossurfactante, de acordo com a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg, 1987. Foram utilizados 3 diferentes tipos de óleos (óleo de soja, óleo de motor e óleo diesel) e a análises feitas em duplicatas.

Em tubos graduados foram adicionados 1mL de óleo e, em seguida, 1mL do biossurfactante produzido. Os tubos foram agitados em vortéx por um minuto e deixados em repouso por 24 horas. Após 24 horas realizou-se a análise do índice de emulsão através da medida da camada emulsificada e da camada total. O cálculo do índice de emulsão foi feito de acordo com a equação (1):

$$\% = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}} \quad (1)$$

3.2.6 Testes de Estabilidade

Uma nova fermentação foi realizada com a melhor condição de produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em caldo de resíduo de abacaxi e submetida à testes de

estabilidade a fim de verificar a capacidade do biossurfactante em se manter ativo frente a alterações de temperatura, pH e concentrações salinas.

Os testes de estabilidade foram realizados baseados em Barros, 2008.

3.2.6.1 Estudo de estabilidade térmica

Em 5 tubos de ensaio foram adicionados 10mL da solução de biossurfactante produzido, previamente centrifugadas, e mantidos em estufa a 100 °C por períodos de 20, 40, 60, 100 e 140 minutos. Mais 4 amostras da mesma solução foram aquecidas a 121 °C por períodos de 20, 40 e 60 minutos. Após tratamento térmico, cada solução foi resfriada até temperatura ambiente para medição da tensão superficial.

3.2.6.2 Estudo da estabilidade frente ao pH

Em tubos contendo o biossurfactante, previamente centrifugado, foi adicionado solução tampão fosfato com pH 4, 5, 6, 7 e 8 , nas proporções de 1:1 e 1:2 (solução tampão: solução biossurfactante), agitadas em vortex por 1 minuto e, posteriormente, determinada a tensão superficial de cada.

3.2.6.3 Estudo de estabilidade frente à força iônica

Foram preparadas soluções salinas em diferentes concentrações, 2,5%, 5,0%, 10,0% e 20,0% de NaCl, e colocadas em tubos de ensaio contendo solução centrifugada de biossurfactante, nas proporções de 1:1 e 1:2 (solução salina: solução biossurfactante), agitadas em vortex por 1 minuto e medida a tensão superficial em cada tubo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Fermentações com variação da concentração de glicose

4.1.1 Tensão superficial

A análise da tensão superficial é um dos indicativos da produção de biossurfactantes. A técnica utilizada, do peso da gota, apresentou resultados bastante favoráveis. A diminuição da tensão superficial ao longo do tempo de fermentação evidencia o aumento da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*.

Na primeira análise realizada, com 1% de glicose no preparo do inóculo, obteve-se uma redução da tensão superficial de 23,9 % logo na primeira hora fermentação. Tal índice de redução, entretanto, manteve-se estável durante as 8 horas seguintes em uma redução de aproximadamente 19% e, devido a esta estabilidade, foram coletadas apenas 6 amostras (incluindo a amostra inicial de tempo zero). A tabela 5 e figura 7 apresentam os valores da tensão superficial ao longo do tempo, durante a fermentação com 1% de glicose.

Tabela 5. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com 1% de glicose

Amostra	Tempo (horas)	Tensão Superficial (mN/m)
1	Tempo Zero	62,27
2	1	47,39
3	3	51,34
4	5	51,76
5	7	50,34
6	9	50,33

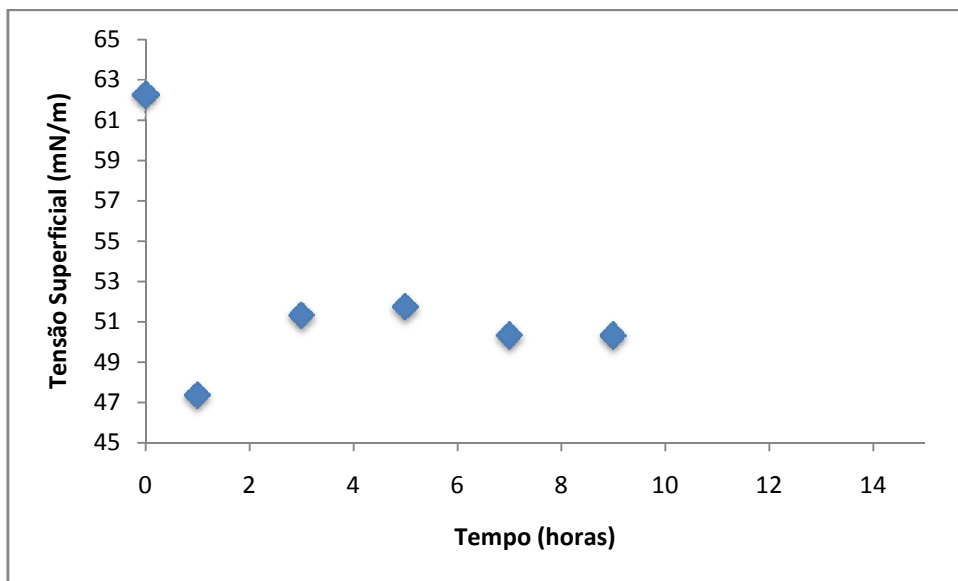


Figura 7. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com 1% de glicose

A variação apresentada na segunda amostra, após uma hora de fermentação, cuja redução de tensão é maior que nas amostras seguintes, pode estar relacionada ao fato de que cada amostra foi coletada de um frasco diferente, podendo haver variações na quantidade de biossurfactante produzido de um frasco para o outro.

A alta redução de tensão logo na primeira hora de fermentação, juntamente com a estabilidade de redução ao longo do tempo pode ser resultado de um consumo imediato de toda a glicose disponível para desenvolvimento do microrganismo. Nesta primeira fermentação não foi realizada a padronização de quantidade de microrganismos no inóculo. Sendo assim, uma maior concentração de bactérias no inóculo competiram pela fonte de carbono, resultando em seu consumo ao início da fermentação. A falta de padronização gera uma alta concentração de microrganismo, não havendo nutrientes suficientes para que ocorra um desenvolvimento e, consequente produção de biossurfactante, gradual ao longo das horas de fermentação.

Na segunda análise, aumentou-se a concentração de glicose no preparo do inóculo para 3%.

Observa-se uma redução de apenas 8,1% na primeira hora de fermentação, entretanto essa redução aumenta ao longo do tempo, chegando à 25,1% após nove horas de fermentação, valor considerado bastante satisfatório tratando-se de análises iniciais em laboratório.

A última amostra coletada, após 24 horas de fermentação, apresentou um valor alto de tensão, sem redução significativa em relação a tensão apresentada na amostra inicial de tempo zero. Tal resultado pode ser explicado devido ao fato de que cada amostra foi coletada de um frasco diferente, devido as condições de assepsia do laboratório, para evitar resultados positivos ou negativos provenientes de uma possível contaminação das amostras. Em condições assépticas favoráveis, ou seja, em um ambiente com garantia de esterilidade, com capela de fluxo laminar, por exemplo, os 6 pontos de amostra poderiam ser retirados do mesmo frasco e, provavelmente, tal variação não seria obtida.

Um possível erro de inoculação, por exemplo, pode ter sido o responsável pela não redução no sexto frasco.

A tabela 6 e figura 8 apresentam os valores de tensão superficial ao longo do tempo, indicando resultados bastante favoráveis para a análise. Estudos apontam que biossurfactantes efetivos devem reduzir, pelo menos em 20% a tensão superficial.

Tabela 6. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com 3% de glicose

Amostra	Tempo (horas)	Tensão Superficial (mN/m)
1	Tempo Zero	63,82
2	1	58,68
3	3	57,16
4	5	51,50
5	7	51,56
6	9	47,74
7	24	62,60

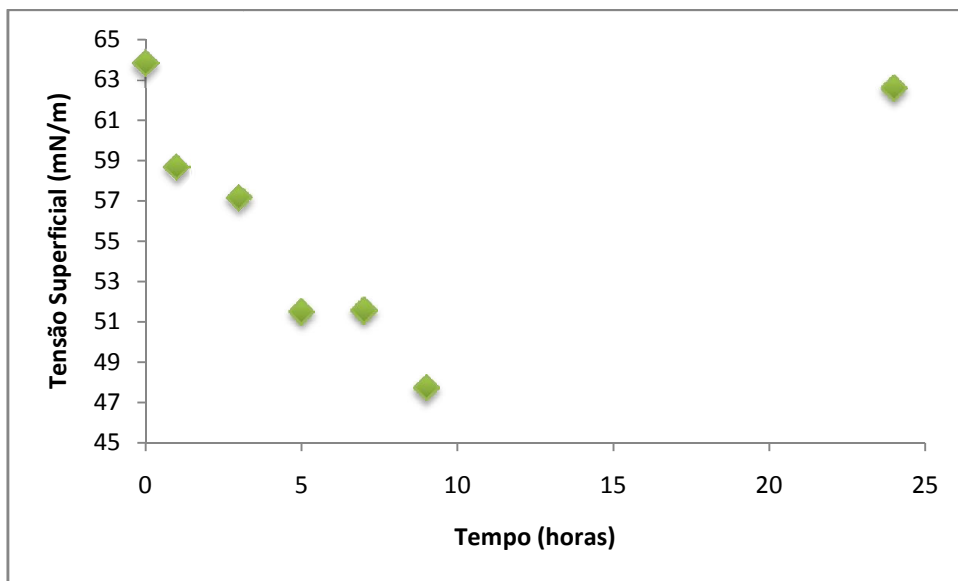


Figura 8. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com 3% de glicose

A terceira e última análise de viabilidade e eficácia na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em resíduo do abacaxi foi realizada com uma concentração de 5% de glicose no preparo do inóculo.

Essa fermentação mostrou-se mais efetiva no que diz respeito à redução da tensão superficial e, conseqüentemente, na produção de biossurfactantes. Assim como observado com 3% de glicose, a redução na primeira hora de fermentação foi baixa, de apenas 6,3%. Há, contudo, um aumento gradual dessa redução ao longo do tempo, chegando a uma redução de 21,6% após 7 horas de fermentação e de 25,3% após 24 horas. Além de uma maior redução de tensão em relação as fermentações com 1% e 3% de glicose, a diminuição da tensão apresentou mais gradual, com excessão da amostra 6, com 9 horas de fermentação, que possui um pequeno desvio em relação a amostra anterior, podendo esse desvio ser atribuído à erros analíticos ou, até mesmo, variação por se tratar de frascos diferentes, como já explicado anteriormente.

A tabela 7 e figura 9 apresentam os resultados de tensão superficial obtidos na análise com 5% de glicose.

Tabela 7. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com 5% de glicose

Amostra	Tempo (horas)	Tensão Superficial (mN/m)
1	Tempo Zero	64,54
2	1	60,01
3	3	57,16
4	5	55,75
5	7	50,20
6	9	54,06
7	24	48,25

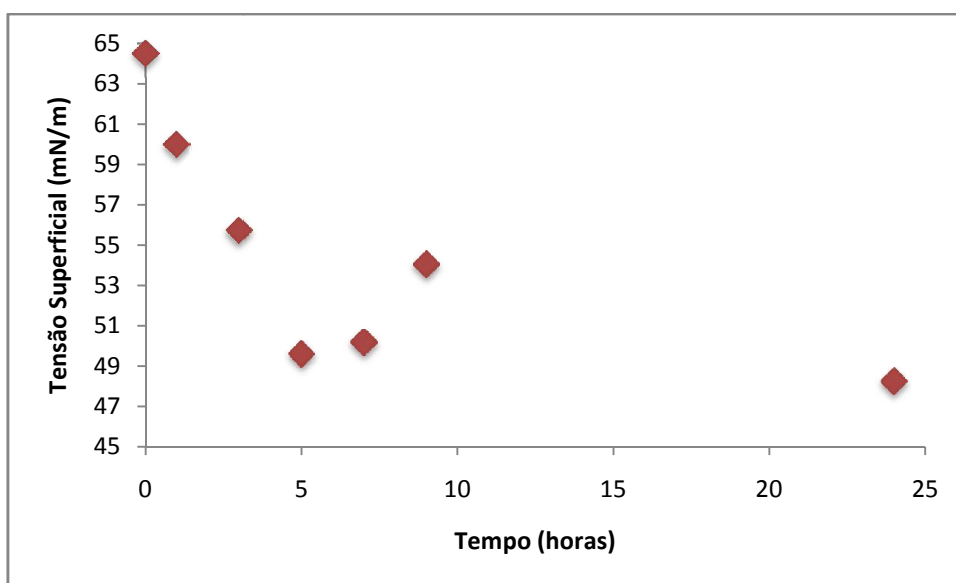


Figura 9. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com 5% de glicose

A produção de biossurfactantes foi mais eficaz quando se utilizando 5% de glicose para preparo do inóculo. A glicose é uma excelente fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento do microrganismo. A quantidade e qualidade do biossurfactante produzido depende, além das condições impostas no processo de fermentação como temperatura e agitação, das condições de cultivo do microrganismo, incluindo as fontes de carbono. Os resultados melhores foram obtidos com concentrações mais altas de glicose, o que indica a necessidade do consumo dessa fonte de carbono pelo *Bacillus* para o seu desenvolvimento.

O aumento da quantidade de glicose possibilitou um consumo gradual da glicose pelo microrganismo, ao longo do tempo de fermentação, favorecendo o aumento do percentual de redução da tensão superficial.

Sabe-se que os biossurfactantes além de reduzirem a tensão superficial, apresentam propriedade emulsificantes e detergentes. Diversas análises quali e quantitativas são realizadas e reportadas afim de se comprovar a produção dos biossurfactantes em condições específicas. Entretanto, uma simples análise visual pode ser um indicativo inicial da atividade do microrganismo na produção, como observado na figura 10. A formação de uma camada de espuma, apresentada nas amostras após fermentação com 5% de glicose é um indício de que realmente houve produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* quando utilizado o resíduo do abacaxi como substrato.

Fernandes et al (2007), também avaliaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em shaker, por 52 horas, porém com um substrato industrial altamente enriquecido. Os resultados por eles obtidos também foram bastante favoráveis e confirmaram uma estabilidade de produção após 20 horas de fermentação, não havendo necessidade de estender o processo fermentativo. Em suas análises, obtiveram uma redução da tensão inicial de 54 mN/m para 30mN/m após 20 horas de produção, o que resulta em uma redução de 44%.

É válido ressaltar que, apesar de uma maior redução apresentada por Fernandes et al. (2007), a adição de nutrientes comerciais ao substrato encarecem o processo e podem inviabilizar a produção devido ao custo total.

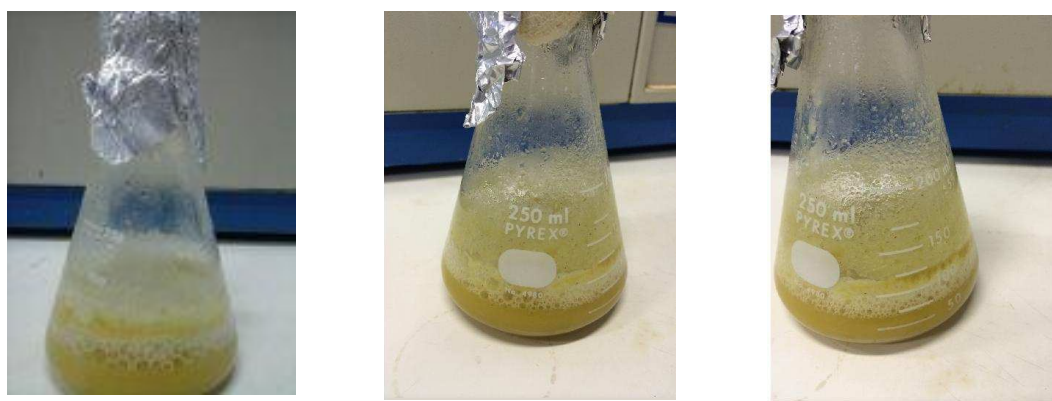


Figura 10. Imagens das amostras após produção de biossurfactantes com 5% de glicose

4.1.2 Índice de Emulsão

A análise do índice de emulsão foi realizada através da proporção óleo/biossurfactante, comparando o poder de emulsificação do biossurfactante produzido quando adicionado a três tipos

de óleo, o óleo de soja, óleo de motor e óleo diesel. Entretanto, não houve formação de emulsão nos testes com óleo diesel, provavelmente devido a baixa viscosidade do óleo em questão, sendo as análises descartadas. A propriedade de emulsificação é apresentada pelos biossurfactantes é bastante explorada, garantindo diversas aplicações para esses compostos.

Em frascos plásticos graduados contendo 1 mL de óleo (cada frasco contendo um tipo de óleo, separadamente) foi adicionado 1 mL do biossurfactante produzido, agitado em vórtex por 1 minuto e deixado em repouso por 24 horas. Após o repouso, os índices foram calculados e os valores obtidos avaliados.

A tabela 8 apresenta os valores obtidos após fermentação com 1% de glicose.

Tabela 8. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com 1% de glicose

Amostras	Tempo (horas)	Índice Obtido após 24 h de Repouso	
		Óleo de Soja	Óleo de Motor
1	1	47,0 %	37,5 %
2	3	47,0 %	40,0 %
3	5	60,0 %	35,7 %
4	7	53,1 %	35,7 %
5	9	51,6 %	40,0 %

Observa-se que em todas as amostras houve a formação da camada de emulsão, sendo os percentuais obtidos na análise com óleo de soja mais elevados do que os obtidos com óleo de motor. Entretanto não há uma variação expressiva desse índice ao longo do tempo, fato esperado uma vez que, na análise de tensão superficial com 1% de glicose, observou-se uma estabilidade na redução durante as 9 horas de análise. Apesar disso, o melhor índice alcançado chegou em 60% com o óleo de soja, após 5 horas de fermentação, valor viável para o uso do biossurfactante produzido como agente emulsificante.

Os valores da tabela 9 são resultados obtidos no teste de emulsão realizado no processo fermentativo com 3% de glicose, na qual também podemos observar presença de emulsão em todas as amostras.

Tabela 9. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com 3% de glicose

Amostras	Tempo (horas)	Índice Obtido após 24 h de Repouso	
		Óleo de Soja	Óleo de Motor
1	1	43,3 %	51,8 %
2	3	33,3 %	61,5 %
3	5	48,6 %	50,0 %
4	7	45,4 %	44,1 %
5	9	54,5 %	51,5 %
6	24	32,26%	45,94%

Com o aumento da concentração de glicose, aumentaram-se os índices obtidos com as análises realizadas com óleo de motor, com valores superiores à 40%. Apesar disso, observa-se uma maior variação dos índices com o óleo de soja, sendo o máximo (54,5%) obtido após nove horas de fermentação, tempo no qual se obteve a maior redução da tensão superficial também.

Ademais, observa-se baixos índices de emulsão, tanto com óleo de soja, quanto com óleo de motor na amostra 6 (após 24 horas de fermentação), resultado compatível com o obtido na análise de tensão superficial, a qual não apresentou redução na última amostra.

Por fim, a tabela 10 apresenta os índices obtidos após fermentação com 5% de glicose.

Tabela 10. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com 5% de glicose

Amostras	Tempo (horas)	Índice Obtido após 24 h de Repouso	
		Óleo de Soja	Óleo de Motor
1	1	34,4 %	62,5 %
2	3	46,7 %	68,0 %
3	5	46,9 %	53,3 %
4	7	42,4 %	46,7 %
5	9	42,1 %	55,9 %
6	24	52,9 %	36,7 %

Observa-se um aumento gradual do índice obtido com óleo de soja, com 52,9% de emulsão ao final da fermentação. Os índices apresentando com o óleo de motor, entretanto, apresentaram uma redução gradual ao longo da fermentação, atingindo valores de 68% no início do processo fermentativo, mas caindo para 36,7% ao final da fermentação.

De maneira geral, em todas as condições de fermentação impostas, observou-se formação de emulsão, viabilizando o uso do biossurfactante produzido como agente emulsificante. Entretanto, observa-se que os índices apresentados com o óleo de soja foram mais estáveis com 1% de glicose, variando entre eles em 13%, contra 18% na fermentação com 5% de glicose e 22% na fermentação com 3%.

Os testes realizados com óleo de motor apresentaram resultados com menores variações também na análise com 1% de glicose, apesar dos índices inferiores nessa condição em relação às fermentações com 3% e 5%.

4.1.3 Análise do pH

Outro ponto verificado foi o pH das amostras antes e após fermentação, para avaliar se a produção de biossurfactantes resultou em alguma alteração de pH do meio durante adaptação e desenvolvimento do microrganismo.

As tabelas 11, 12 e 13 apresentam os valores de pH obtidos nas amostras retiradas ao longo das fermentações com 1%, 3% e 5% de glicose. Observa-se que o pH manteve-se constante em todas as condições, na faixa do pH 3. A variação decimal apresentada entre uma amostra e outra dentro de um mesmo processo fermentativo não está relacionada à produção do biossurfactante e sim a margem de erro da própria leitura no pHmetro e diferenças entre as próprias amostras.

Tabela 11. Leitura do pH das amostras de biossurfactantes, com 1% de glicose

Amostra	Tempo	pH
Tempo Zero	0	3,83
1	1	3,89
2	3	3,72
3	5	3,80
4	7	3,71
5	9	3,85

Tabela 12. Leituras do pH das amostras de biossurfactantes, com 3% de glicose

Amostra	Tempo (h)	pH
Tempo Zero	0	3,91
1	1	3,89
2	3	3,86
3	5	3,78
4	7	3,75
5	9	3,91
6	24	3,87

Tabela 13. Leituras do pH das amostras de biossurfactantes, com 5% de glicose

Amostra	Tempo (h)	pH
Tempo Zero	0	3,52
1	1	3,66
2	3	3,81
3	5	3,72
4	7	3,67
5	9	3,01
6	24	3,71

4.2 Análise com Glicerol

Após avaliação da melhor condição de fermentação, dentre as realizadas com 1%, 3% e 5% de glicose, e concluindo que os melhores resultados foram os obtidos com 5% de glicose, novas fermentações foram realizadas, fixando a concentração de glicose em 5% e enriquecendo o substrato com diferentes concentrações de glicerol comercial.

A adição do glicerol ao caldo do resíduo do abacaxi teve como objetivo fornecer uma segunda fonte de carbono para consumo do microrganismo e avaliar o seu crescimento e consequente produção de biossurfactante.

Foram realizadas, portanto, três novas fermentações, variando as concentrações de glicerol em 3%, 5% e 10% e analisada tensão superficial, índice de emulsão e pH das amostras.

4.2.1 Tensão Superficial

Os dados das análises de tensão superficial realizadas após fermentações com substrato enriquecido com glicerol visaram avaliar se o aumento de uma fonte de carbono alternativa ao microrganismo favorece ou não o desenvolvimento do mesmo e consequente produção de biossurfactante.

Para realização dessas fermentações, manteve-se a concentração de glicose em 5%, por ser a condição que apresentou maior redução da tensão superficial, como evidenciado nos resultados anteriormente descritos. A variação ocorreu portanto, no aumento da concentração do glicerol.

A tabela 14 e a figura 11 apresentam os resultados obtidos após 24 de fermentação com adição de 3% de glicerol ao substrato.

Tabela 14. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 3% de glicerol

Amostra	Tempo (horas)	Tensão Superficial (mN/m)
1	Tempo Zero	64,13
2	1	62,19
3	3	58,60
4	5	58,37
5	7	54,12
6	9	49,22
7	24	51,77

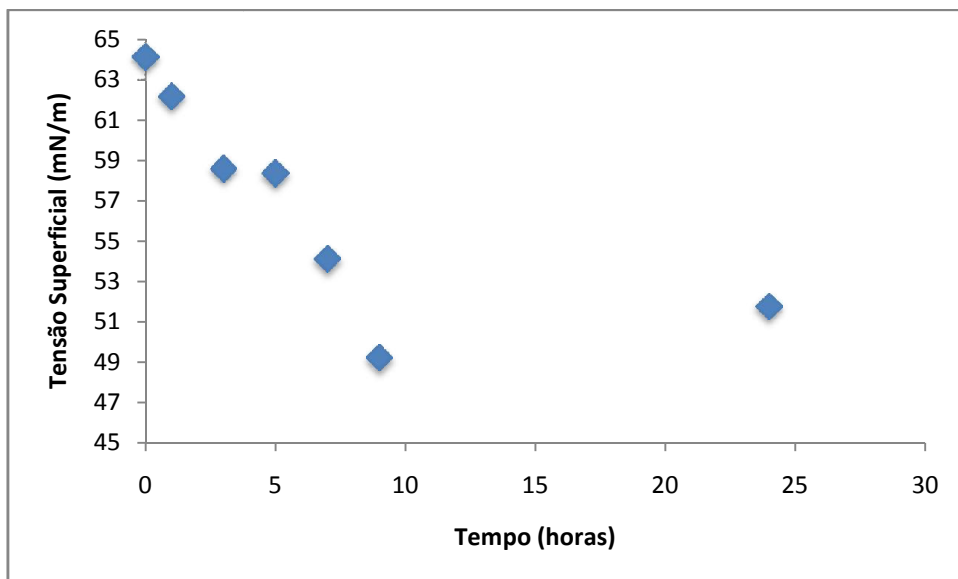


Figura 11. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 3% de glicerol

Observa-se uma boa redução na tensão superficial, chegando a 23,2% após 9 horas de fermentação. Além disso, é possível verificar uma redução gradual ao longo da fermentação, da mesma forma como foi observado no processo sem adição de glicerol, havendo um consumo gradativo da glicose e do glicerol pelos microrganismos presentes no meio.

Entretanto, não houve aumento da redução da tensão em relação a fermentação sem o enriquecimento de glicerol, sendo a porcentagem de redução inferior à observada em todas as fermentações realizadas apenas com glicose, sem adição de glicerol, não compensando, neste caso, realizar a adição de 3% do componente.

A tabela 15 e figura 12 apresentam os resultados obtidos com a adição de uma concentração maior de glicerol (5%).

Tabela 15. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 5% de glicerol

Amostra	Tempo (horas)	Tensão Superficial (mN/m)
1	Tempo Zero	64,94
2	1	61,27
3	3	58,42
4	5	52,73
5	7	50,74
6	9	53,82
7	24	51,05

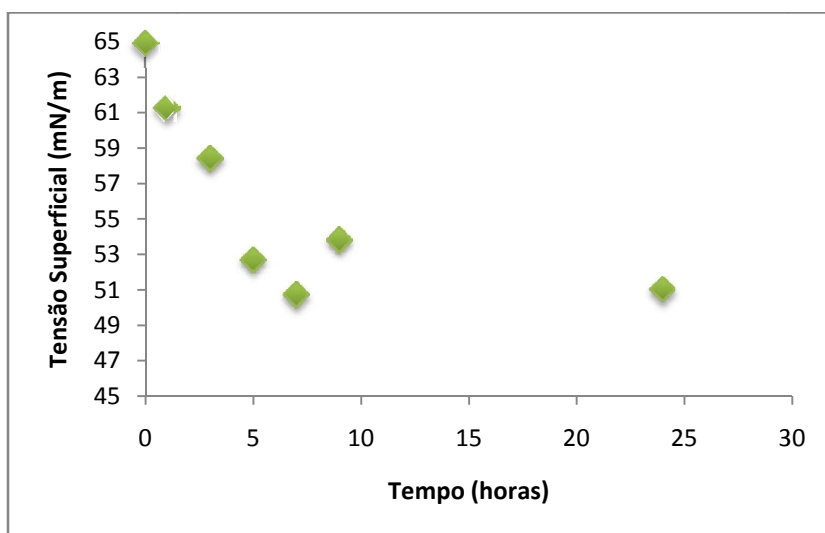


Figura 12. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 5% de glicerol

O aumento da concentração não apresentou resultados favoráveis, uma vez que a porcentagem de redução da tensão superficial caiu para 21,9%, mais uma vez inviabilizando a adição de glicerol ao substrato.

Por fim, uma última fermentação foi realizada com adição de uma concentração de glicerol de 10% ao substrato.

A tabela 16 e a figura 13 ilustram os resultados obtidos com tal condição

Tabela 16. Valores de tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 10% de glicerol

Amostra	Tempo (horas)	Tensão Superficial (mN/m)
1	Tempo Zero	63,14
2	1	60,56
3	3	57,63
4	5	54,94
5	7	54,92
6	9	58,50
7	24	61,78

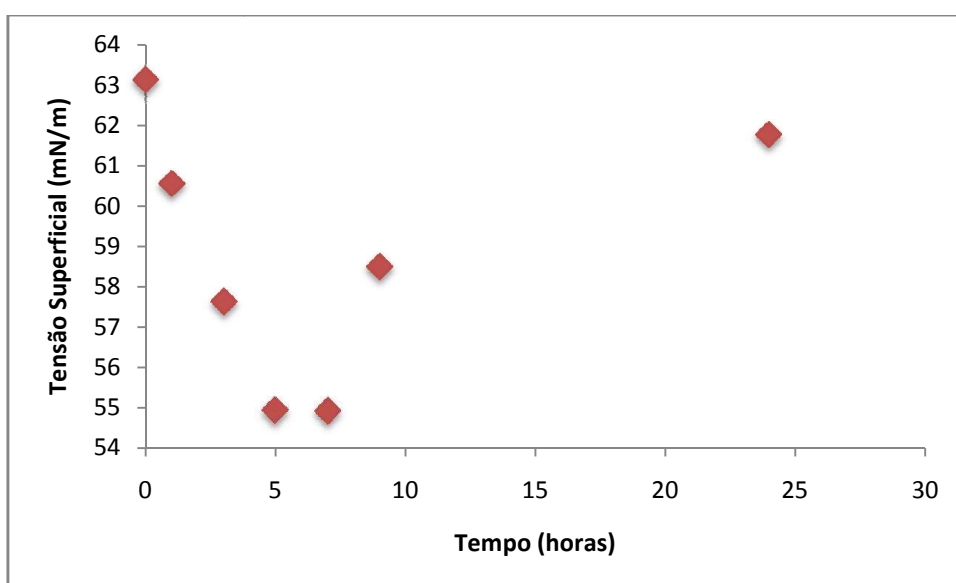


Figura 13. Análise da tensão superficial ao longo do tempo, com substrato enriquecido com 10% de glicerol

A adição de maiores quantidades de glicerol não foram favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo. A redução da tensão na fermentação com 10% de glicerol foi de apenas 13%, valor considerado muito baixo, tornando inviável a produção de biossurfactantes nessa condição.

O acréscimo de glicerol mostrou-se inviável uma vez que, mesmo em pequenas concentrações não favorece a produção de biossurfactantes, e o aumento dessa quantidade torna a produção ainda mais ineficaz.

O glicerol é considerado uma boa fonte de carbono à microrganismos produtores de biossurfactantes, entretanto, no caso em questão, altas concentrações de glicerol resultaram em

uma maior dificuldade à adequação do *Bacillus subtilis* refletindo em uma menor redução da tensão superficial, ou seja, menor produção de biossurfactante.

4.2.2 Índice de Emulsão

Para as fermentações com adição de glicerol também foi avaliada a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido. Novamente, não houve formação de emulsão nas análises com óleo diesel, sendo estas descartas.

As tabelas 17, 18 e 19 apresentam os índices de emulsão resultantes do processo fermentativo com 3%, 5% e 10% de glicerol, respectivamente.

Apesar dos resultados pouco favoráveis obtidos na análise de tensão superficial, observa-se que uma boa atividade de emulsificação em todas as fermentações.

Tabela 17. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com substrato enriquecido com 3% de glicerol

Amostras	Tempo (horas)	Índice Obtido após 24 h de Repouso	
		Óleo de Soja	Óleo de Motor
1	1	31,0 %	62,5 %
2	3	40,0 %	53,6 %
3	5	43,3 %	60,0 %
4	7	46,9 %	58,1 %
5	9	46,7 %	58,3 %
6	24	40,6 %	46,7 %

Quando comparados com os resultados obtidos na fermentação com 5% de glicose, sem adição do glicerol, observa-se uma menor capacidade de emulsão com óleo de soja na análise realizada com o substrato enriquecido com 3% de glicerol, uma vez que os índices alcançaram apenas 46,9% contra 52,9% apresentado na fermentação sem a segunda fonte de carbono. Entretanto, os resultados com óleo de motor, sofreram menos variação, apesar de se manter a queda do índice de emulsão ao longo do tempo de fermentação.

Tabela 18. Índice de emulsão de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com substrato enriquecido com 5% de glicerol

Amostras	Tempo (horas)	Índice Obtido após 24 h de Repouso	
		Óleo de Soja	Óleo de Motor
1	1	58,1 %	48,3 %
2	3	53,1 %	45,2 %
3	5	46,2 %	60,0 %
4	7	40,6 %	50,0 %
5	9	46,9 %	58,6 %
6	24	48,4 %	51,7 %

Na fermentação com substrato enriquecido com 5% de glicerol, apresentado na tabela 18 acima, os índices de emulsão mantiveram-se na média dos 45% quando em óleo de soja e 50% quando em óleo de motor. Observa-se uma melhor estabilidade nos índices obtidos com óleo de motor, não apresentando uma redução ao longo do processo fermentativo.

Enfim, os resultados de índice de emulsão apresentados após fermentação com substrato enriquecido com 10% de glicerol apresentaram resultados com valores máximos semelhantes aos das fermentações anteriores, porém uma estabilidade maior entre os índices durante o processo fermentativo, além de não decaírem ao longo da fermentação.

No que diz respeito a capacidade emulsificante do biossurfactante produzido, a adição de glicerol não interferiu negativamente, como observado nas análises de tensão superficial.

Braga et al. (2009) produziram biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* comparando meios enriquecidos com glicose e glicerol. As análises de índice de emulsão e biomassa não foram favoráveis em meios enriquecidos com glicerol. O índice de emulsão foi avaliado com querosene em 12, 24, 36 e 48 horas, e observou-se baixos índices com 10% de glicerol, chegando a não produzir emulsão em 36 horas. Já com glicose e glicerol a 1%, os índices foram próximos e favoráveis, variando de 25 à 30% em todos os tempos de retirada de amostras.

Tabela 19. Índice de emulsificação de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, com substrato enriquecido com 10% de glicerol

Amostras	Tempo (horas)	Índice Obtido após 24 h de Repouso	
		Óleo de Soja	Óleo de Motor
1	1	51,4 %	44,8 %
2	3	48,6 %	41,4 %
3	5	55,9 %	46,9 %
4	7	50,0 %	53,3 %
5	9	51,4 %	47,1 %
6	24	54,3 %	56,2 %

4.2.3 Análise do pH

Assim como observado nas fermentações realizadas sem adição de glicerol, não ocorreram variações do pH do meio ao longo do processo fermentativo, nem com o aumento da concentração de glicerol.

Além disso, também não se observa alteração de pH das fermentações com glicerol em relação à fermentação apenas com glicose, sendo que os valores foram mantidos na faixa do pH 3, indicando que não há interferência das fontes de carbono.

As tabelas 20, 21 e 22 apresentam os dados de leitura de pH das amostras durante as fermentações com 3%, 5% e 10% de glicerol, respectivamente.

Tabela 20. Leituras do pH das amostras de biossurfactante, com substrato enriquecido com 3% de glicerol

Amostra	Tempo (h)	pH
Tempo Zero	0	3,89
1	1	3,86
2	3	3,83
3	5	3,84
4	7	3,83
5	9	3,70
6	24	3,74

Tabela 21. Leituras do pH das amostras de biossurfactante, com substrato enriquecido com 5% de glicerol

Amostra	Tempo (h)	pH
Tempo Zero	0	3,97
1	1	3,88
2	3	3,82
3	5	3,94
4	7	3,74
5	9	3,89
6	24	3,86

Tabela 22. Leituras do pH das amostras de biossurfactante, com substrato enriquecido com 10 % de glicerol

Amostra	Tempo (h)	pH
Tempo Zero	0	3,89
1	1	3,83
2	3	3,90
3	5	3,91
4	7	3,83
5	9	3,88
6	24	3,91

4.3 Testes de Estabilidade

Dentre as inúmeras vantagens apresentadas pelos biossurfactantes, a estabilidade frente à condições adversas extremas é uma característica apresentada por grande parte desses compostos biológicos.

Entretanto, os diferentes microrganismos e suas diversas linhagens tendem a se comportar de maneira distinta quando impostos à mudanças de condições, seja de temperatura, pH ou composição do meio.

É preciso, portanto, estudar o tipo de microrganismo adequado para a aplicabilidade de interesse e verificar se o mesmo é estável nas condições em que serão utilizados. A estabilidade

sob condições adversas é de grande importância pois a maioria das áreas requer um comportamento constante da eficiência do produto.

Foram realizados testes de estabilidade a partir do biossurfactante produzido dentro da melhor condição testada (com 5% de glicose e sem adição de glicerol) e os resultados reportados a seguir.

4.3.1 Estabilidade frente à temperatura

Uma fermentação foi realizada e uma amostra, após redução da tensão superficial em 22,3% (Tabela 23), foi utilizada para testes de estabilidade frente à temperaturas de 100 °C e 121° C.

Tabela 23. Valores de tensão superficial da amostra inicial e da amostra pós fermentação, para testes de estabilidade frente à temperatura

Tensão Superficial Tempo Zero	Tensão Superficial após fermentação
65,46	50,83

A figura 14 apresenta os resultados de tensão superficial obtidos após exposição da amostra de biossurfactante à temperatura de 100 °C em tempos de 20, 40, 60, 100 e 140 minutos. Observa-se que a linhagem de *Bacillus* estudada não apresentou estabilidade dentro dessas condições, sendo que sua tensão superficial voltou à inicial logo nos primeiros 20 minutos de exposição.

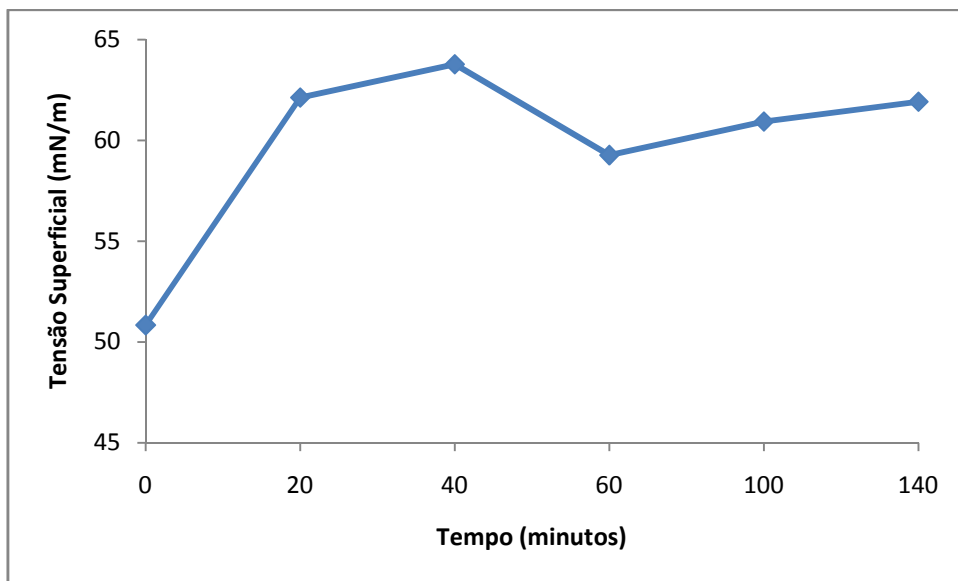


Figura 14. Análise da tensão superficial após exposição das amostras à temperatura de 100 °C

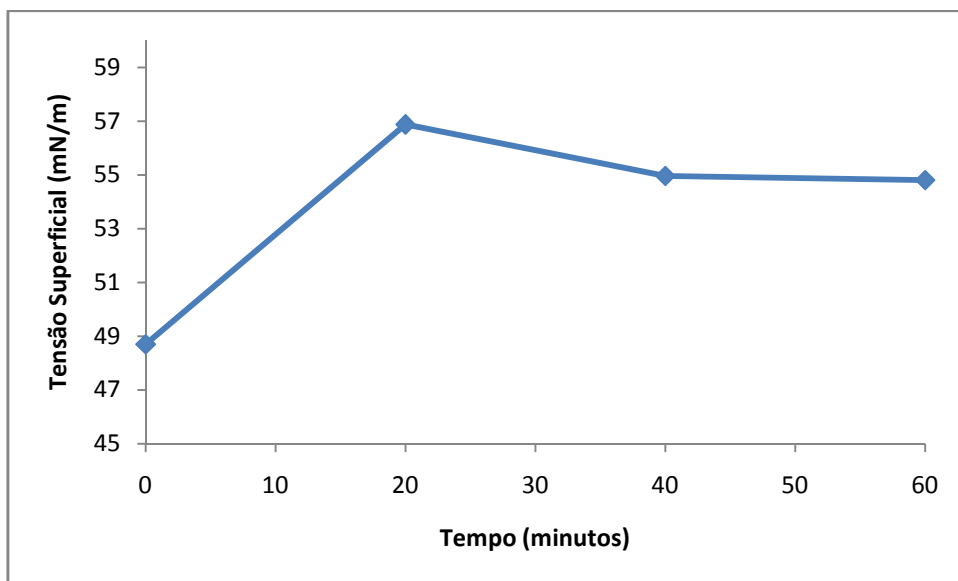


Figura 15. Análise da tensão superficial após exposição das amostras à temperatura de 121°C

Da mesma forma apresentada na estabilidade à 100°C, o biossurfactante não se mostrou estável quando exposto à temperatura de 121°C, perdendo sua capacidade de redução na tensão superficial também nos primeiros 20 minutos de exposição.

A estabilidade frente à temperatura varia de uma linhagem de microrganismo para outra. Estudos realizados por Kim *et al.* (1997) apontaram uma estabilidade frente à temperatura de

100°C por até 1 hora. Entretanto, Costa (2005) observou, com uma linhagem diferente de *Bacillus subtilis* uma estabilidade à 100 °C de até 2 horas e à 121 °C de 0,5 horas.

4.3.2 Estabilidade frente à força iônica

Uma nova fermentação foi realizada e uma amostra, após redução da tensão superficial (Tabela 24), foi utilizada para testes de estabilidade frente à força iônica.

Tabela 24. Valores de tensão superficial da amostra inicial e da amostra após fermentação, para testes de estabilidade frente à força iônica

Tensão Superficial Tempo Zero	Tensão Superficial após fermentação
59,82	50,68

Assim como nos testes de estabilidade à temperatura, o biossurfactante não se manteve estável com a adição de solução salina, nem mesmo nas concentrações mais baixas, tanto para as análises na proporção de 1:1 (solução salina:biossurfactante), quanto na proporção de 1:2 (Figuras 16 e 17).

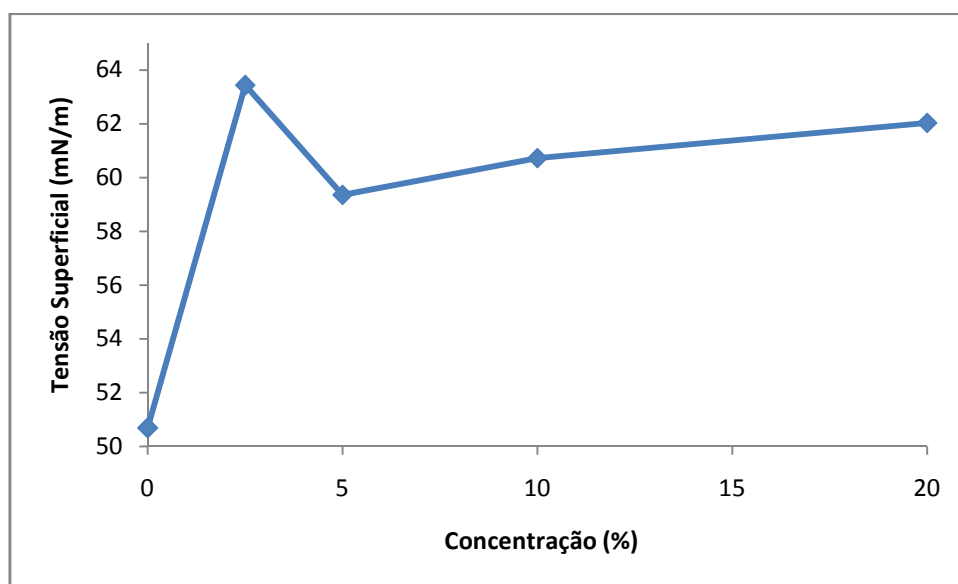


Figura 16. Análise de tensão superficial após adição de solução de NaCl na proporção de 1:1

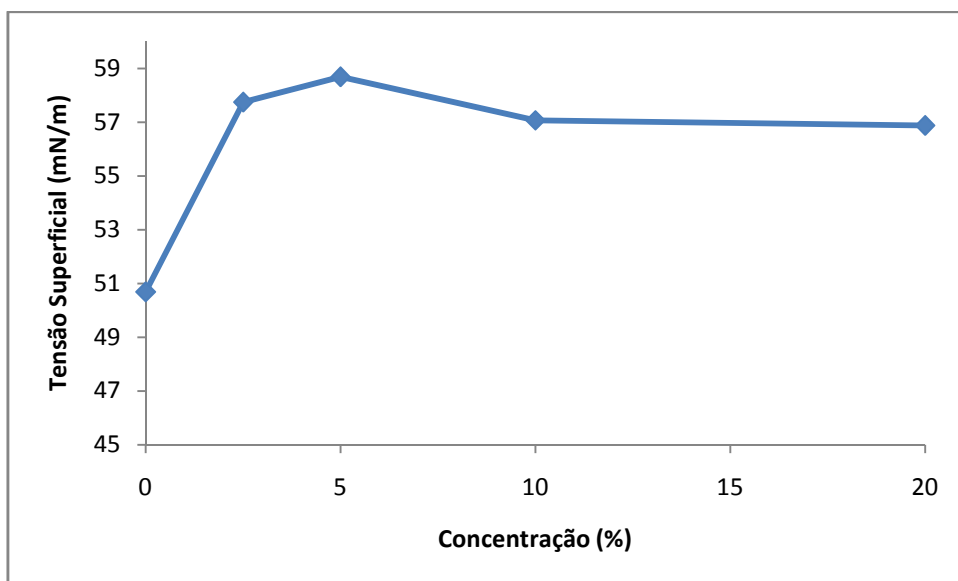


Figura 17. Análise de tensão superficial após adição de solução de NaCl na proporção de

4.3.3 Estabilidade frente à alteração de pH

Assim como os testes de estabilidade anteriormente apresentados, a alteração do pH não favoreceu a estabilidade do biossurfactante produzido.

Uma terceira fermentação foi realizada, nas melhores condições encontradas (5% de glicose, sem enriquecimento com glicerol) e uma amostra, após redução da tensão superficial (Tabela 25), utilizada para testes de estabilidade.

Tabela 25. Valores de tensão superficial com amostra inicial e amostra após fermentação, para testes de estabilidade frente à alteração do pH

Tensão Superficial Tempo Zero (g)	Tensão Superficial após 5 h de fermentação
61,38	48,7

As tabelas 26 e 27 apresentam os resultados de tensão superficial obtidos após adição de solução com diferentes pHs em proporções de 1:1 e 1:2 (solução:biossurfactante), respectivamente. Novamente, não observa-se estabilidade do biossurfactante produzido quando exposto à tal condição.

Tabela 26. Análise da tensão superficial após a adição de soluções com diferentes pHs, na proporção de 1:1

pH	Proporção Solução pH: Biossurfactante	Tensão Superficial
4.0	1:1	59,14
5.0	1:1	59,58
6.0	1:1	63,32
7.0	1:1	61,88
8.0	1:1	56,30

Tabela 27. Análise da tensão superficial após adição de soluções com diferentes pHs, na proporção de 2:1

pH	Proporção Solução pH: Biossurfactante	Tensão Superficial
4.0	1:2	60,50
5.0	1:2	58,88
6.0	1:2	64,04
7.0	1:1	62,59
8.0	1:2	57,17

Há, porém, uma tendência nos valores das tensões superficiais após exposição, que são semelhantes para ambas proporções dentro de cada faixa de pH, como ilustrado na Figura 18. O aumento da tensão em pH acima de 6 também foi observado por Kim et al. (1997), Costa (2005) e Barros et al. (2008). Uma possível razão para este fenômeno é a precipitação do biossurfactante em meio alcalino.

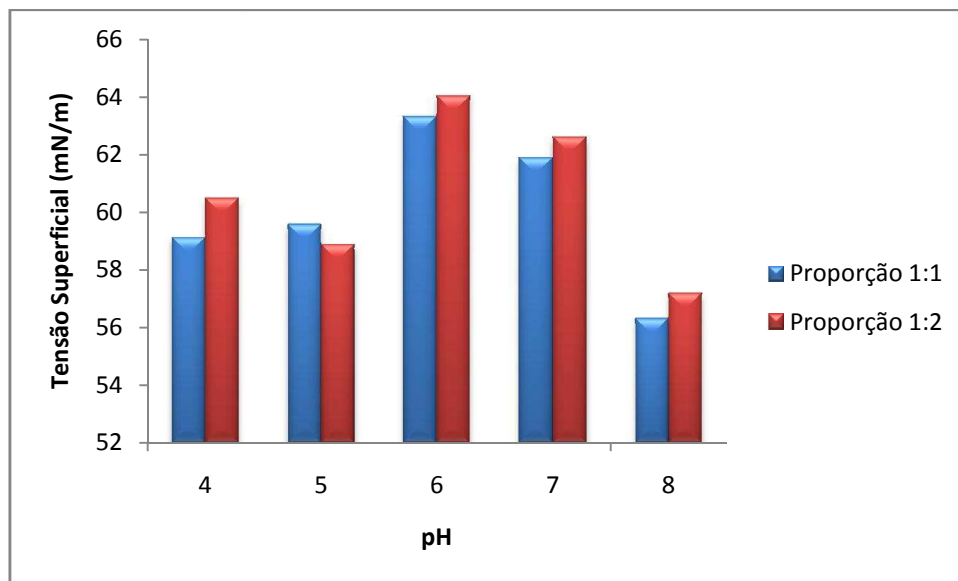


Figura 18. Gráfico comparativo das tensões superficiais obtidas nas duas proporções, em diferentes valores de pH

5. CONCLUSÕES

Com os dados experimentais obtidos, observa-se que a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* foi bastante efetiva, uma vez que os melhores resultados, obtidos com 5% de Glicose e sem adição de Glicerol, alcançaram uma redução da tensão superficial em 25,23% .

Os índices de emulsão foram bastante favoráveis em todas as condições, garantindo a boa atividade emulsificante do biossurfactante produzido, havendo uma tendência de melhores emulsões quando utilizado

As análises realizadas com o enriquecimento de glicerol apresentaram uma maior efetividade com a menor concentração de glicerol (3%), reduzindo a tensão superficial em 23%. Observa-se, portanto, que a produção de biossurfactantes não foi favorecida com o aumento da quantidade de glicerol no substrato. Isso pode estar relacionado à uma maior dificuldade à adequação do *Bacillus subtilis*, refletindo em uma menor redução da tensão superficial.

É válido ressaltar, que os estudos apresentados neste trabalho foram realizados apenas com glicerol comercial, sendo necessário uma avaliação do comportamento do *Bacillus* na produção de biossurfactantes quando expostos à substrato enriquecidos com glicerol provenientes de fontes renováveis ou residuais, para certificar que o enriquecimento com esta fonte de carbono não é realmente viável ao processo.

A utilização de glicerol oriundo da produção de biodiesel, por exemplo, pode apresentar vantagens por conter elementos nutricionais como o fósforo, magnésio, enxofre e nitrogênio, que são factíveis de serem utilizados pelos microrganismos para a produção, podendo haver uma melhora na redução da tensão em relação à apresentada neste trabalho com o uso de glicerol PA.

Os testes de estabilidade não se apresentaram favoráveis, uma vez que a estabilidade frente as condições impostas não foi verificada, porém estudos apontam diferenças nas estabilidade de acordo com a linhagem do microrganismo, se fazendo necessária novas análises para verificação de tais parâmetros e condições.

As diversas vantagens apresentadas pelos biossurfactantes quando comparados aos surfactantes sintéticos, aliadas ao uso de substratos renováveis para a redução do custo de produção dos mesmos, tornando sua utilização economicamente factível, viabilizam a aplicação dos biossurfactantes em diversos ramos industriais. O presente trabalho evidenciou a possibilidade e viabilidade em se produzir biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando o resíduo do

processamento do abacaxi como substrato. Há, ainda, uma necessidade de aprimorar e ampliar o processo de produção de biossurfactantes utilizando o resíduo do abacaxi como substrato, desenvolvendo tecnologias mais avançadas e monitorando e adequando novas condições de produção e estabilidade que permitam seu emprego em escala industrial.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Aprimorar a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* com o resíduo do abacaxi como substrato, para obtenção de maiores reduções na tensão superficial.

Realizar testes de glicose para verificar o consumo do microrganismo para a produção de biossurfactante.

Testar a adição de diferentes íons para avaliar a quantidade e qualidade de biossurfactante produzido.

Realizar testes comparativos com adição de glicerol proveniente de resíduos em relação à adição de glicerol P.A.

Realizar testes comparativos utilizando o talo do abacaxi como substrato juntamente com a casca.

Realizar novos testes de estabilidade em diferentes condições e com diferentes linhagens de *bacillus*.

Realizar testes de caracterização do biossurfactante produzido.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.J. **Estudo da Utilização do Glicerol Oriundo da Cadeia de Biodiesel por *Bacillus subtilis* para a Produção de Biossurfactantes, Enzimas e Aromas.** 2011. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.
- ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; SILVA, C.A.A.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de Biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 Utilizando Milhocina e Óleo de Milho Pós-Fritura como Nutrientes. **Arq. Inst. Biol.**, v. 80, n. 1, p. 334-341, 2014.
- BANAT, I.M. Characterization of Biosurfactants and their Use in Pollution Removal-State of the Art (Review). **Acta Biotechnol**, v. 15, p. 251-267, 1995.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- 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.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical Structure, Surface Properties and Biological Activities of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from Soapstock. **Antonie van Leeuwenhek**, v. 85, p. 1-8, 2004.

BENTO, F.M.; CARMAGO, F.A.O.; OKEKE, B. Bioremediation of Soil Contaminated by Diesel Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 65-68, 2003.

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.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. **Colloid and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 157, n. 1, p. 41-52, 1999.

BRAGA, M.A.; LIMA, I.S.; APOLINÁRIO, M.G.; GOMES, T.R.S.; ARAÚJO, R.S.; PAZ, M.C.F. Produção de Biosurfactantes por *Chromobacterium violaceum* com Glicose e Glicerol como Fonte de Carbono. **IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**. 2009. Belém, PA.

CASTIGLIONI, G.L.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Produção de Biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* Utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

COELHO, D.F. **Purificação de Bromelina dos Resíduos do Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por Precipitação integrada à Sistema Bifásico Aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional**. 2012. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

COSTA, G.A.N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. 2005. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R. Synthesis of Biosurfactant in Extreme Conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

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

DECESARO, A.; RIGON, M.R.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. Produção de Biossurfactantes por Microrganismos Isolados de Solos Contaminados com Óleo Diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potencial. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 61, n.1, p. 47-64, 1997.

DIAZ, P.S. **Técnicas de Preservação do Microrganismo**. Universidade Federal de Pelotas, 2013. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/1469950/> . Acesso em: outubro/2014.

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

FERNANDES, P.A.V.; ARRUDA, I.R.; SANTOS, A.F.A.B.; ARAÚJO, A.A.; MAIOR, A.M.S.; XIMENES, E.A. Antimicrobial Activity of Surfactants Produced by *Bacillus subtilis* R14 Against Multidrug-Resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709, 2007.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A.K. Production and Properties of a Biosurfactant Obtained from a Member of *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **J Colloid Interface Sci**, v. 324, 2008.

HABA, E.; SPUNY, M.J.; BUSQUETS, M. Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from Waste Frying Oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Rio de Janeiro, 2013.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A Glyco-Lipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KIM, H.S.; YOON, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, p.41-46, 1997.

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

KOSARIC, N.; CAIMS, W.L.; GRAY, N.C.C. **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 342, 1987.

KRONEMBERGER, F.A. **Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em Biorreator com Oxigenação por Contactor de Membranas**. 2007. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

KUSHIDA, M.M. **Caracterização Parcial e Propriedades de Biossurfactantes Bacterianos**. 2000. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

LIMA JUNIOR, G.A. **Obtenção de Surfactina pelo Micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2008. Tese de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, L.Q.; TAKAKI, G.M.C. Produção de Biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em Caldo de Abacaxi (*Ananas comosus*) com Óleo

de Girassol Pós-Fritura e Aplicação na Remoção de Derivado do Petróleo. **Exacta**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.

LIN, S. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An Update to the Use of Unconventional Substrates for Biosurfactant Production and their New Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANETTI, L.M. Metabólitos Secundários da Família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MANO, M.C.R. **Estudo da Recuperação, Concentração e Purificação de Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis***. 2008. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, Campinas, SP.

MATOS, A.P.; CUNHA, G.A.P.; ALMEIDA, C.O. **Produção Integrada no Brasil**. 1.ed. Mistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2008. Cap. 5: Produção Integrada do Abacaxi, p. 105-143.

MONTAGNOLLI, R.N. **Biodegradação de Derivados de petróleo com Aplicação de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis***. 2011. Tese de Mestrado Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista -USP, Rio Claro, SP.

MORAES, D.T. **Produção de Lipopeptídeo Surfactina a partir de uma Cepa de *Bacillus subtilis* com o Operon *srfA* sob Controle do Promotor Regulado *Pgrac***. 2010. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

MORGADO, I.F.; AQUINO, C.N.P.; TERRA, D.C.T. Aspectos Econômicos da Cultura do Abacaxi: Sazonalidade de Preços no Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 26, n.1, p. 44-47, 2004.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards Commercial Production of Microbial Surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, N.C.; GIBBS, F.B. **Biosurfactants: Production, Properties and Applications**. Capítulo. Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. Marcel Dekker: New York, NY, p. 329-368, 1993.

MULLIGAN, N.C. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, Commercial Production and Application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quím. 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. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 36-41, 2006.

PACCEZ, J.D. **Aplicação de Linhagens Geneticamente Modificadas de *Bacillus subtilis* no Desenvolvimento de Vacina de Mucosas Contra Patógenos Entéricos**. 2007. Tese de Doutadora Faculdade de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP.

PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Avaliação Cinética da Produção de Biossurfactantes Bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

RAHMAN, P.; GAKPE, E. Production, Characterization and Applications of Biosurfactants - Review. **Biotechnology**, v. 7, p. 360-370, 2008.

RODRÍGUEZ, D.; GRAJAL-MARTÍN, M.J.; ISIDRÓN, M.; PETIT, S.; HORMAZA, J.I. Polymorphic Microsatellite Markers in Pineapple (*Ananas cosmosus* (L.) Merrill). **Scientia Horticulturae**, v. 156, p. 127-130, 2013.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and Low Molecular Mass Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; TORRES FILHO, P.; **Situação da Culutura no mundo e no Brasil e Importância Econômica.** In CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília: EMBRAPA: Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 403-430, 1999.

SEN, R. **Biosurfactants**. New York, NY: Springer-Verlag New York, 2010.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel Bioemulsifiers from Microorganisms for Use in Foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants Treatment of Crude Oil Contaminated Soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 456-464, 2004.

VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Acta**, v. 9, p. 241-252, 1991.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. *Bacillus subtilis* as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: a Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 299-310, 2004.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Bioreactor Design for Enhanced Carrier-assisted Surfactin Production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochem**, v. 48, 2006.

ANEXOS

ANEXO A. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação com 1% de Glicose

Tabela A 1. Dados de tensão superficial

Amostra	Tempo (horas)	Peso de 10 gotas (g)	
		Análise 1	Análise 2
Tempo Zero		0,6272	0,5964
1		0,4629	0,4682
2		0,5020	0,5068
3		0,5259	0,4914
4		0,4985	0,4906
5		0,5121	0,4769

Tabela A 2. Dados de índice de emulsão

Amostra	Tempo	Índice após 24 horas de repouso							
		Oléo de Soja				Oléo de Motor			
		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)	
1		0,7	0,9	1,7	1,7	0,7	0,5	1,6	1,6
2		0,7	0,9	1,6	1,8	0,6	0,6	1,5	1,5
3		0,9	0,9	1,5	1,5	0,6	0,4	1,3	1,5
4		0,8	0,9	1,5	1,7	0,5	0,5	1,5	1,3
5		0,8	0,8	1,6	1,5	0,6	0,6	1,5	1,5

ANEXO B. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação com 3% de Glicose.

Tabela B 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo

Leitura inicial (abs)	Diluição	Leitura Final (abs)
1,200	5mL de inóculo para 70 mL de solução de glicose, cloreto de sódio e peptona.	0,103

Tabela B 2. Dados de tensão superficial

Amostra	Tempo (horas)	Peso de 10 gotas (g)	
		Análise 1	Análise 2
Tempo Zero	0	0,6288	0,6254
1	1	0,5866	0,5667
2	3	0,5706	0,5525
3	5	0,4740	0,5380
4	7	0,5212	0,4921
5	9	0,4680	0,4703
6	24	0,6032	0,6270

Tabela B 3. Dados de índice de emulsão

Amostra	Tempo	Índice após 24 horas de repouso							
		Óleo de Soja				Óleo de Motor			
		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)	
1		0,6	0,7	1,5	1,5	0,7	0,7	1,3	1,4
2		0,4	0,6	1,5	1,5	0,7	0,9	1,3	1,3
3		0,9	0,8	1,8	1,7	0,8	1,0	1,8	1,8
4		0,7	0,8	1,7	1,6	0,9	0,7	1,6	1,8
5		1,0	0,7	1,8	1,5	0,9	0,8	1,7	1,6
6		0,5	0,5	1,5	1,6	0,8	0,9	1,8	1,9

ANEXO C. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação com 5% de Glicose.

Tabela C 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo

Leitura inicial (abs)	Diluição	Leitura Final (abs)
0,620	8,4mL de inóculo para 50 mL de solução de glicose, cloreto de sódio e peptona.	0,097

Tabela C 2. Análise de tensão superficial

Amostra	Tempo (horas)	Peso de 10 gotas (g)	
		Análise 1	Análise 2
Tempo Zero	0	0,6319	0,6363
1	1	0,5807	0,5986
2	3	0,5586	0,5371
3	5	0,4833	0,4916
4	7	0,4867	0,4997
5	9	0,5340	0,5283
6	24	0,4730	0,4751

Tabela C 3. Dados de índice de emulsão

Amostra	Tempo	Índice após 24 horas de repouso							
		Óleo de Soja				Óleo de Motor			
		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)	
1	1	0,5	0,6	1,5	1,7	0,8	0,7	1,2	1,2
2	3	0,7	0,7	1,5	1,5	0,9	0,8	1,2	1,3
3	5	0,7	0,8	1,5	1,7	0,8	0,8	1,5	1,5
4	7	0,7	0,7	1,7	1,6	0,7	0,7	1,5	1,5
5	9	0,7	0,9	1,9	1,9	0,9	1,0	1,4	2,0
6	24	0,9	0,9	1,5	1,9	0,4	0,7	1,4	1,6

ANEXO D. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação com 5% de Glicose, enriquecido com 3% de Glicerol.

Tabela D 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo

Leitura inicial (abs)	Diluição	Leitura Final (abs)
1,239	5mL de inóculo para 80 mL de solução de glicose, cloreto de sódio e peptona.	0,115

Tabela D 2. Dados de tensão superficial

Amostra	Tempo (horas)	Peso de 10 gotas (g)	
		Análise 1	Análise 2
Tempo Zero	0	0,6266	0,6337
1	1	0,6049	0,6173
2	3	0,5654	0,5862
3	5	0,5781	0,5690
4	7	0,5475	0,5160
5	9	0,4694	0,4979
6	24	0,4918	0,5256

Tabela D 3. Dados índice de emulsão

Amostra	Tempo	Índice após 24 horas de repouso							
		Óleo de Soja				Óleo de Motor			
		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)	
1	1	0,4	0,5	1,4	1,5	0,8	0,7	1,2	1,2
2	3	0,7	0,5	1,5	1,5	0,8	0,7	1,5	1,3
3	5	0,6	0,7	1,5	1,5	0,8	0,7	1,2	1,3
4	7	0,7	0,8	1,6	1,6	0,9	0,9	1,5	1,6
5	9	0,7	0,7	1,5	1,5	0,7	0,7	1,2	1,2
6	24	0,7	0,6	1,6	1,6	0,7	0,7	1,4	1,6

ANEXO E. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação com 5% de Glicose, enriquecido com 5% de Glicerol.

Tabela E 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo

Leitura inicial (abs)	Diluição	Leitura Final (abs)
0,824	7,5mL de inóculo para 75 mL de solução de glicose, cloreto de sódio e peptona.	0,105

Tabela E 2. Dados de tensão superficial

Amostra	Tempo (horas)	Peso de 10 gotas (g)	
		Análise 1	Análise 2
Tempo Zero	0	0,6497	0,6265
1	1	0,6071	0,5969
2	3	0,5782	0,5699
3	5	0,5183	0,5179
4	7	0,5031	0,4939
5	9	0,5371	0,5205
6	24	0,4967	0,5066

Tabela E 3. Dados de índice de emulsão

Amostra	Tempo	Índice após 24 horas de repouso							
		Óleo de Soja				Óleo de Motor			
		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)	
1	1	0,9	0,9	1,5	1,6	0,7	0,7	1,4	1,5
2	3	0,8	0,9	1,7	1,5	0,6	0,8	1,5	1,6
3	5	0,7	0,7	1,5	1,6	1,0	0,8	1,5	1,5
4	7	0,6	0,7	1,6	1,6	0,8	0,7	1,5	1,5
5	9	0,7	0,8	1,6	1,6	0,8	0,9	1,4	1,5
6	24	0,9	0,6	1,5	1,6	0,7	0,8	1,4	1,5

ANEXO F. Dados experimentais obtidos nas análises realizadas após fermentação com 5% de Glicose, enriquecido com 10% de Glicerol.

Tabela F 1. Padronização da quantidade de microrganismo no inóculo

Leitura inicial (abs)	Diluição	Leitura Final (abs)
0,931	8mL de inóculo para 72 mL de solução de glicose, cloreto de sódio e peptona.	0,102

Tabela F 2. Dados de tensão superficial

Amostra	Tempo (horas)	Peso de 10 gotas (g)	
		Análise 1	Análise 2
Tempo Zero	0	0,6064	0,6343
1	1	0,5915	0,5986
2	3	0,5739	0,5586
3	5	0,5378	0,5419
4	7	0,5519	0,5274
5	9	0,5785	0,5711
6	24	0,6161	0,5978

Tabela F 3. Dados de índice de emulsão

Amostra	Tempo	Índice após 24 horas de repouso							
		Óleo de Soja				Óleo de Motor			
		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)		Altura Camada Emulsão (cm)		Altura Camada Total (cm)	
1	1	0,8	1,0	1,7	1,8	0,5	0,8	1,4	1,5
2	3	0,8	0,9	1,7	1,8	0,6	0,6	1,4	1,5
3	5	1,0	0,9	1,6	1,8	0,7	0,8	1,5	1,7
4	7	0,9	0,9	1,7	1,9	0,8	0,8	1,5	1,5
5	9	0,8	1,0	1,6	1,9	0,8	1,8	1,7	1,7
6	24	0,9	1,0	1,6	1,9	0,8	1,0	1,5	1,7