



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Carolina Gomes da Silva

**Estudo da produção de biossurfactante por *Bacillus
amyloliquefaciens* em fermentação em estado sólido**

São José do Rio Preto
2020

Jéssica Carolina Gomes da Silva

Estudo da produção de biossurfactante por *Bacillus amyloliquefaciens* em fermentação em estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto
2020

S586e	<p>Silva, Jéssica Carolina Gomes da</p> <p>Estudo da produção de biossurfactante por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> em fermentação em estado sólido / Jéssica Carolina Gomes da Silva. -- São José do Rio Preto, 2020</p> <p>85 p. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi</p> <p>1. Ciência e tecnologia de alimentos. 2. Microbiologia e bioprocessos. 3. Biossurfactante. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Farelo de trigo. I. Título.</p>
-------	---

Jéssica Carolina Gomes da Silva

Estudo da produção de biossurfactante por *Bacillus amyloliquefaciens*
em fermentação em estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dra. Gisele Ferreira Bueno
UFRJ – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Márcio José Tiera
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
9 de Setembro de 2016

*Aos meus amados pais,
Adriana Aparecida de Oliveira e Alcir Gomes da Silva,
Dedico.*

Agradecimentos

Ao programa de Pós-Graduação e ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, pela dedicação, compromisso e confiança nesta aluna que o admira muito e sente-se muito honrada por sua orientação e pelos constantes ensinamentos, sempre transmitidos com muito carinho.

A Dra. Gisele Ferreira Bueno, por todo o apoio concedido desde o início, para que este trabalho pudesse ser realizado e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Márcio José Tiera pela colaboração e confiança no empréstimo do tensiômetro, um dos equipamentos essenciais para realizar as análises deste trabalho.

As estagiárias, Ana Sílvia e Vanessa, pela ajuda, carinho e dedicação na execução deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Bioprocessos da UNESP de São José do Rio Preto, por estarem sempre dispostos a ajudar e também pelos momentos de alegria que me proporcionaram.

As minhas amigas Luciana, Letícia e Janaína, pelo companheirismo, amizade.

A minha família, Adriana e Alcir e Júnior, que me deram incentivo e amor, sem medir esforços e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Por fim, agradeço a Deus, por me abençoar, por me conceder saúde, força para lutar pelos meus objetivos.

RESUMO

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana de alta biodegradabilidade e baixa toxicidade. Possuem alta capacidade emulsificante tornando-se vantajosos frente a surfactantes sintéticos, podendo substituir os emulsificantes convencionais, originando assim um maior apelo mercadológico por serem produtos considerados naturais. Estudos desenvolvidos com o *Bacillus amyloliquefaciens* têm mostrado que o subproduto farelo de trigo apresenta-se como um bom substrato para a produção do biossurfactante adjunto de óleo de fritura como agente indutor e água destilada (como solução umidificadora) em 48 horas de fermentação. Testes preliminares, para avaliar a influência do tempo na produção de biossurfactante, mostraram que foi possível obter bons resultados de índice de emulsificação abaixo de 42 horas de fermentação e nas 36 e 48 horas são obtidas reduções na tensão superficial. Fermentações suplementadas com FeSO_4 , NaSO_4 e MnSO_4 causaram efeito negativo na redução da tensão superficial, no entanto a estabilidade da emulsão mostrou-se estável nas concentrações de NaSO_4 testadas, mas ainda equiparáveis à fermentação sem metais. Foi possível obter um biossurfactante que se mantivesse estável em fermentações de 24, 30 e 36 horas, sendo mais vantajoso trabalhar com 24 horas, por apresentar emulsões estáveis e vantagem econômica em tempo de processo.

Palavras-chave: Biossurfactante. *Bacillus amyloliquefaciens*. Farelo de trigo. Fermentação em Estado Sólido. Índice de Emulsificação.

ABSTRACT

Biosurfactants are microbial origination compounds with high biodegradability and low toxicity that have high emulsifying capacity making it advantageous compared to synthetic surfactants, they may become substitutes for conventional emulsifiers, resulting in a greater market attraction for being considered natural products. Studies conducted with *Bacillus amyloliquefaciens* have shown that wheat bran is a good substrate for the production of the biosurfactant with frying oil as inducer and distilled water (as humidifier solution) at 48 hours of fermentation. Preliminary tests to evaluate the time influence in production showed that it was possible to obtain a good emulsification index below 42 and 36 hours of fermentation and reducing the surface tension at 48 hours. Supplemented with FeSO₄, NaSO₄ and MnSO₄ caused negative effect in reducing the surface tension, the emulsion stability was stable in NaSO₄ concentrations, but it is still comparable to the fermentation without metals. It was possible to obtain a biosurfactant stable in fermentations 24, 30 and 36 hours being most advantageous to work with 24 hours fermentations because shows stable emulsions and economic advantage in fermentation process.

.

Keywords: Biosurfactant. *Bacillus amyloliquefaciens*. Wheat bran. Solide State Fermentation. Emulsification index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Medidas de tensão superficial nos diferentes tempos de fermentação	30
Gráfico 2 - Medidas de índice de emulsificação nos diferentes tempos de fermentação	31
Gráfico 3 - Medidas de tensão superficial em diferentes concentrações de sulfato de ferro	32
Gráfico 4 - Medidas de índice de emulsificação para diferentes concentrações de sulfato de ferro e o padrão	33
Gráfico 5 - Medidas de tensão superficial em diferentes concentrações de sulfato de sódio e o padrão	34
Gráfico 6 - Medidas de índice de emulsificação em diferentes concentrações de sulfato de sódio e o padrão	35
Gráfico 7 - Medidas de tensão superficial em diferentes concentrações de sulfato de manganês e o padrão	36
Gráfico 8 - Medidas de índice de emulsificação para diferentes concentrações de sulfato de manganês e o padrão	37
Gráfico 9 - Comparação entre o efeito dos metais FeSO_4 , NaSO_4 e MnSO_4 na tensão superficial e o padrão	38
Gráfico 10 - Comparação entre o efeito dos metais FeSO_4 , NaSO_4 e MnSO_4 no índice de emulsificação em 24 horas de fermentação e o padrão	39
Gráfico 11 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 24 horas de fermentação	41
Gráfico 12 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e umidade em 24 horas de fermentação	42
Gráfico 13 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 24 horas de fermentação	43

Gráfico 14 - Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 24 horas de fermentação	45
Gráfico 15 - Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada com a umidade e temperatura em 24 horas de fermentação	46
Gráfico 16 - Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada com a concentração do indutor e temperatura em 24 horas de fermentação	47
Gráfico 17 - Superfície ajustada para a produção quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 24 horas de fermentação	49
Gráfico 18 - Superfície ajustada para a produção quando comparada com a temperatura e umidade em 24 horas de fermentação	50
Gráfico 19 - Superfície ajustada para a produção quando comparada com a concentração do indutor e umidade em 24 horas de fermentação	51
Gráfico 20 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparadas a umidade e a temperatura em 30 horas de fermentação	53
Gráfico 21 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparadas a concentração do indutor e a temperatura em 30 horas de fermentação	54
Gráfico 22 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparadas a concentração do indutor e a umidade em 30 horas de fermentação	55
Gráfico 23 - Superfície ajustada para a índice de emulsificação quando comparada com a temperatura e umidade em 30 horas de fermentação	57
Gráfico 24 - Superfície ajustada para a índice de emulsificação quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 30 horas de fermentação	58
Gráfico 25 - Superfície ajustada para a índice de emulsificação quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 30 horas de fermentação	59
Gráfico 26 – Superfície ajustada para a produção quando comparada com a umidade e temperatura em 30 horas de fermentação	61

Gráfico 27 - Superfície ajustada para a produção quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 30 horas de fermentação	62
Gráfico 28 - Superfície ajustada para a produção quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 30 horas de fermentação	63
Gráfico 29 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 36 horas de fermentação	65
Gráfico 30 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e umidade em 36 horas de fermentação	66
Gráfico 31 - Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a concentração do indutor e umidade em 36 horas de fermentação	67
Gráfico 32 - Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada a temperatura e umidade em 36 horas de fermentação	69
Gráfico 33 - Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada a temperatura e concentração do indutor em 36 horas de fermentação	70
Gráfico 34 - Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada a umidade e concentração do indutor em 36 horas de fermentação	71
Gráfico 35 - Superfície ajustada para a produção quando comparada a temperatura e umidade em 36 horas de fermentação	73
Gráfico 36 - Superfície ajustada para a produção quando comparada a temperatura e concentração do indutor em 36 horas de fermentação	74
Gráfico 37 - Superfície ajustada para a produção quando comparada umidade e concentração do indutor em 36 horas de fermentação	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tensão Superficial e concentração micelar crítica de surfactantes sintéticos e biossurfactantes	17
Tabela 2 – Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos	19
Tabela 3 - Planejamento experimental fatorial de 33, em três níveis, para avaliar a influência de manganês, ferro e sódio na produção de biossurfactante	26
Tabela 4 - Planejamento experimental, por delineamento central composto rotacional, para avaliar a influência da concentração do indutor, umidade, temperatura na fermentação em 24, 30 e 36 horas de fermentação	27
Tabela 5 - Tensão superficial para biossurfactantes em 24 horas de fermentação	40
Tabela 6 - Índice de emulsificação para o biossurfactante obtido em 24 horas de fermentação	44
Tabela 7 - Produção de biossurfactantes produzidos em 24 horas de fermentação	48
Tabela 8 -Tensão superficial do biossurfactante em 30 horas de fermentação	52
Tabela 9 - Índice de emulsificação do biossurfactante em 30 horas de fermentação	56
Tabela 10 - Produção de biossurfactante em 30 horas de fermentação	60
Tabela 11 - Tensão superficial em 36 horas de fermentação	64
Tabela 12 - Índice de emulsificação do biossurfactante em 36 horas de fermentação	68
Tabela 13 - Produção de biossurfactante em 36 horas de fermentação	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
atm	Atmosfera de pressão
CMC	Concentração micelar crítica
FEA	Faculdade de Engenharia de Alimentos
FeSO₄	Sulfato de ferro
g/L	Gramas por litro
HCl	Ácido clorídrico
IE	Índice de emulsificação
m/v	Massa por volume
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mN/m	Milinewton metro
MnSO₄	Sulfato de manganês
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaSO₄	Sulfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	155
2.2. Objetivos específicos	155
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Surfactantes	16
3.2. Biossurfactantes	18
3.2.1. Classificação dos biossurfactantes	20
3.2.2. Propriedades dos biossurfactantes	20
3.3. Produção de biossurfactantes	21
3.4. Aplicação de biossurfactante na indústria de alimentos	222
4. MATERIAL E MÉTODOS	244
4.1. Micro-organismo	244
4.1.1. Manutenção da cepa	24
4.2. Esterilização dos meios	24
4.3. Processo fermentativo e substrato	25
4.3.1. Inóculo	25
4.3.2. Meio para fermentação em estado sólido	25
4.3.3. Perfil de produção do biossurfactante em relação ao tempo	25
4.3.4. Influência de metais na produção de biossurfactante	26
4.3.5. Influência da concentração do indutor, umidade, tempo e temperatura na fermentação	26
4.4. Extração do biossurfactante	27
4.5. Determinação da tensão superficial	28
4.6. Determinação do índice de emulsificação	28
4.7. Purificação e quantificação do biossurfactante	28
4.8. Análise estatística	29
5. RESULTADOS	29
5.1. Perfil de produção do biossurfactante em relação ao tempo	29
5.2. Influência de metais na produção de biossurfactante	31
5.3. Influência da concentração do indutor, umidade, temperatura em 24, 30 e 36 horas de fermentação	39
5.3.1. Fermentações realizadas em tempo de 24 horas	39
5.3.2. Fermentações realizadas em tempo de 30 horas	51

5.3.3. Fermentações realizadas em tempo de 48 horas.	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	766
REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

A maior parte dos surfactantes consumidos atualmente em países industrializados é de origem petroquímica, pertencendo a uma categoria de compostos químicos de importância para diversos setores industriais. Contudo, a preocupação ambiental em relação aos produtos oriundos do setor petroquímico respaldada pelas legislações ambientais tem gerado interesse pela substituição de compostos não biodegradáveis.

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que possuem propriedades de redução da tensão superficial e alta capacidade emulsificante. Os biossurfactantes são, de fato, uma opção para a sucessão dos surfactantes existentes, uma vez que possuem alta biodegradabilidade e baixa toxicidade, constituindo vantagens adicionais sobre os surfactantes. Assim, podem ser uma alternativa a emulsificantes convencionais em alimentos e cosméticos, originando maior apelo mercadológico pelo fato de serem produtos considerados naturais, além de apropriados para aplicação ambiental.

Entretanto, ainda há uma limitação na produção e aplicação de biossurfactantes na indústria pelo custo elevado de produção em comparação com os surfactantes convencionais.

Os desafios para a produção de biossurfactante estão relacionados com a redução do custo da matéria-prima, aumento de rendimento do produto e processos de produção. A solução para o desenvolvimento da biotecnologia em produção de biossurfactantes está na busca de substratos de baixo custo, aumento do rendimento e produtividade do produto.

O processo de fermentação em estado sólido baseia-se no uso de substratos sólidos com baixa presença de água, o que é uma alternativa viável para a produção de biossurfactante. A fermentação em estado sólido torna possível o uso de resíduos agroindustriais sólidos que são abundantes no Brasil devido à extensiva atividade agroindustrial, podendo reduzir os custos relacionados ao substrato e tornar o produto competitivo no mercado. Além disso, a fermentação em estado sólido evita a formação de espuma durante o processo de fermentação, fator limitante para a obtenção do biossurfactante por fermentação submersa, uma vez que com a formação da espuma há a perda de nutrientes e do produto formado, reduzindo assim o rendimento e produtividade do processo.

Os micro-organismos do gênero *Bacillus* são produtores de biossurfactante da categoria lipopeptídeo, o qual apresenta atividade tensoativa, emulsificante e antimicrobiana.

Pesquisas desenvolvidas com o *Bacillus amyloliquefaciens*, assim como a maioria dos micro-organismos do gênero *Bacillus*, tendo potencial para a produção de tensoativos e emulsificantes.

Baseado nos estudos anteriormente desenvolvidos, o presente trabalho visou buscar e avaliar parâmetros mais economicamente viáveis para uma melhor competitividade na produção de biossurfactante a partir do *B. amyloliquefaciens*, utilizando o subproduto farelo de trigo como substrato.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos do presente trabalho estão descritos a seguir.

2.1. Objetivo geral

Produzir biossurfactante por fermentação em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato, visando a melhoria no processo de produção e a avaliando de suas propriedades.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar o perfil de produção de biossurfactante em relação ao tempo de fermentação a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizando farelo de trigo como substrato;
- Avaliar a influência de metais na produção do biossurfactante;
- Avaliar a influência dos parâmetros: concentração do indutor, umidade, temperatura e tempo de fermentação;
- Determinar a tensão superficial, índice de emulsificação e produção bruta do biossurfactante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Surfactantes

Os surfactantes são compostos de origem química utilizados em uma ampla variedade de processos com aplicação em diversos setores industriais. Segundo Greek (1990), durante a década de 1980, a procura por surfactantes aumentou 300% dentro do setor químico e sua produção excedeu três milhões de toneladas por ano, gerando quatro bilhões de dólares em 2000 (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

A palavra surfactante é oriunda da expressão “surface active agent”, que significa agente de “atividade superficial”, ou seja, surfactante é um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido (JÖNSSON et al., 1998; WATERS; PORTER, 1991).

Os surfactantes disponíveis comercialmente são, em maioria, sintetizados a partir de derivados de petróleo. Porém, a preocupação ambiental e as novas legislações de controle ambiental têm levado à procura por surfactantes naturais, biossurfactantes, como alternativa aos surfactantes de origem química (DESAI; BANAT, 1997).

Surfactantes são moléculas anfipáticas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais tendem a separar-se preferencialmente na interface entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou água/óleo (LIN, 1996; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Outra propriedade de moléculas surfactantes é a formação de agregados orientados, também conhecidos por micelas que, em geral, formam-se em baixas concentrações. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas denomina-se concentração micelar crítica (CMC). A formação de micelas em solução confere ao surfactante a propriedade de detergência e solubilização (BANAT, 2000).

Devido as suas propriedades, o surfactante torna-se conveniente para diversas aplicações industriais: detergentes, lubrificantes, emulsificantes, agentes espumantes e umidificadores na solubilização e dispersão de fases; sendo utilizados em indústrias cosméticas, farmacêuticas, alimentícia, têxteis, de papel e polímeros (KITAMOTO *et al.*, 2002).

A eficácia dos surfactantes é determinada através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre da superfície, por unidade de área

necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 1978; MESQUITA, 2004; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). O surfactante faz com que uma menor energia seja necessária para trazer uma molécula até a superfície e, conseqüentemente, a tensão superficial é reduzida. Nessas condições, pode haver um aumento da concentração de compostos hidrofóbicos na fase aquosa e isso é alcançado pela formação de uma emulsão e solubilização óleo/água acima da concentração micelar crítica (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

A tensão superficial está relacionada com a concentração micelar crítica, conforme Tabela 1. Uma vez que surfactantes eficientes possuem uma baixa concentração micelar crítica, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial (MULLIGAN, 2005).

Tabela 1. Tensão Superficial e concentração micelar crítica de surfactantes sintéticos e biossurfactantes.

Origem	Surfactante	Tensão superficial (mN/M)	CMC (mg/L)
biológico	<i>Rhodococcus rubber</i> AC 235 - glicolípido	26,8	54
biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> - trealose dicorinomicolato	36	4
biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> - trealose tetraester	26	15
biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ramnolípido	29	50-200
biológico	<i>Torulopsis bombicola</i> - soforolípidos	33	82
biológico	<i>Bacillus subtilis</i> - surfactina	27	23
sintético	Dodecil Sulfonato de Sódio (DSS)	37	2120
sintético	Brometo de Cetiltrimetilamônio	30	1300
sintético	Tween 20	30	600
sintético	n-Alqui Benzeno Sulfonato	47	590

Fonte: Mulligan, 2005.

Com essas características, surfactantes são considerados produtos versáteis e com aplicação em diversas indústrias, porém são tóxicos e não biodegradáveis.

Existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos biossurfactantes, devido à necessidade de produtos com baixa toxicidade e biodegradáveis, e também produzidos de matéria prima renovável.

3.2. Biossurfactantes

Biossurfactantes são produtos de origem do metabolismo de micro-organismos que possuem apresentam redução da tensão superficial e atividade emulsificante. Os biossurfactantes podem ser sintetizados por diferentes micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, podendo ser possível a utilização de vários substratos de baixo custo, incluindo açúcares, óleos, alcanos e subprodutos da agroindústria.

Os biossurfactantes apresentam-se vantajosos frente a surfactantes químicos devido a baixa toxicidade, biodegradabilidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, capacidade de serem produzidos por processos relativamente simples, como processo fermentativo, além da capacidade de produção a partir de substratos renováveis (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Consequentemente, biossurfactantes podem se tornar substitutos dos emulsificantes convencionais em alimentos; uma vez que apresentam o apelo comercial de serem considerados produtos naturais (BARROS et al., 2007; NITSCHKE et al., 2005).

3.2.1. Classificação dos biossurfactantes

A classificação dos surfactantes sintéticos tem como base os grupamentos polares, já os biossurfactantes são classificados com base na natureza bioquímica do composto e sua origem microbiana.

As principais classes de biossurfactantes abrangem os: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidosgraxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993). As principais classes de biossurfactantes juntamente com os micro-organismos envolvidos estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos.

Biossurfactante	Micro-organismo
<i>Glicolípido</i>	
ramnolípídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
sforolípídeos	<i>Torulopsis bombicola, T. apicola</i>
trehalolípídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
<i>Lipopeptídios e lipoproteínas</i>	
Peptídeo -lipídeo	<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>
<i>Ácidos graxo, lipídeos neutros e fosfolípídeos</i>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolípídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<i>Surfactantes poliméticos</i>	
emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
liposan	<i>Candida lipolytica</i>
carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Surfactantes particulados</i>	
vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
células	Várias bactérias

Fonte: (DESAI; BANAT,1997).

Segundo Rosenberg e Ron (1999), os biossurfactantes podem ser classificados também a partir da massa molar:

- Baixa massa molar: os glicolípídeos, que são formados por carboidratos e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa, como por exemplo: ramnolípídeos, trealolípídeos, sforolípídeos e os lipopeptídeos, por exemplo, surfactina, gramicidina S e polimixina.

- Alta massa molar: polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos (emulsans), lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros.

3.2.2. Propriedades dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam uma diversidade na composição química e em suas propriedades, todavia, algumas de suas características são comuns à grande maioria dos biossurfactantes. E, além disso, muitas dessas características apresentam-se vantajosas sobre os surfactantes convencionais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes produzem menor tensão superficial em menores concentrações (COOPER; PADDOCK, 1984), desta forma são mais eficientes e efetivos do que os surfactantes convencionais. A tensão superficial e interfacial de biossurfactantes é em torno de 30 e 1 mN/m, respectivamente; e a concentração micelar crítica varia entre 1-2000 mg/L (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Alguns biossurfactantes podem apresentar elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizado em tecnologia de alimentos. O lipopeptídeo produzido pelo *B. licheniformis* é estável a altas temperaturas, em torno de 75°C, por até 140h e pH entre 5 e 12 (HOROWITZ; GILBERT; GRIFFIN, 1990). Surfactantes são inativados a uma concentração salina de 2-3%, enquanto biossurfactantes suportam concentrações de até 10% de NaCl (BOGNOLO, 1999).

Biossurfactantes são facilmente degradáveis em qualquer ambiente, o que os torna adequados para biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

Devido a crescente preocupação ambiental com os efeitos alergênicos da população com produtos de origem química, os biossurfactantes tem recebido um maior destaque frente à sua característica de baixa toxicidade, em comparação aos surfactantes sintéticos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Com isso, também permite o uso em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos.

Os biossurfactantes apresentam-se também vantajosos pela capacidade de serem sintetizados por substratos renováveis e possuem diversidade química, podendo ter aplicação específica; características estruturais e propriedades físicas distintas, tornando-os comparáveis e/ou superiores aos surfactantes sintéticos em

termos de eficiência (REISER et al., 1989). Há também a possibilidade de modificações da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através da engenharia genética, possibilitando o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

3.3. Produção de biossurfactantes

A gama de micro-organismos que produzem biossurfactantes é ampla, sendo que o tipo, quantidade e qualidade do produto são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons no meio de cultura e as condições de cultivo (GEORGIU; LIN; SHARMA, 1992).

Segundo Christof; Ivshina (2002), bactérias produtoras de biossurfactantes incluem: *Pseudomonas aeruginosa* (mono- di-ramnolipídeos), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos e glicolipídeos) *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem *Torulopsis* sp (soforolipídeos) e *Candida* sp (liposan e fosfolipídeos), *Pseudozyma fusiformata* (glicolipídio) e *Aspergillus ustus* (glicoproteína).

O gênero *Bacillus* sp pode produzir biossurfactantes lipoprotéicos como iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina, bacilomicina e surfactina, os quais possuem atividade antimicrobiana (BARROS et al., 2007).

Bacillus subtilis, uma bactéria comum de solo, produz um biossurfactante lipopeptídeo cíclico conhecido como surfactina. A surfactina possui uma estrutura anfifílica associada com uma alta atividade surfactante e tem a propriedade biológica de afetar tumores, bactérias, fungos, vírus e micoplasmas, além de apresentar baixa concentração micelar crítica e alto poder de redução da tensão superficial (VOLLENBROICH et al., 1997; QUEIROGA; NASCIMENTO; SERRA, 2003; LANG, 2002; BARROS et al., 2007).

Segundo Aquino (2011), o *Bacillus amyloliquefaciens* tem demonstrado capacidade de produção de biossurfactantes, com bons resultados de emulsificação, quando utilizado o subproduto farelo de trigo como substrato.

Bueno (2014), através de estudos, comprovou que a produção de biossurfactante através de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, quando se

utiliza o farelo de trigo como substrato e óleo residual de soja como agente indutor, possuem resultados equiparáveis; e que foi possível obter bons resultados de índice de emulsificação e redução da tensão superficial em 48 horas em fermentação em estado sólido.

Para tornar a produção de biossurfactante viável, é necessária a busca por substratos de baixo custo, e que mantenham as condições nutricionais necessárias para o cultivo do micro-organismo e obtenção do biossurfactante.

O uso de substratos de baixo custo, como subprodutos agroindustriais, é uma importante estratégia para melhorar e facilitar o desenvolvimento industrial da produção de biossurfactantes (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2005).

O farelo de trigo é o substrato mais pesquisado e utilizado para a fermentação em estado sólido, por ser uma excelente fonte de carbono e nitrogênio (SILVEIRA, 2007). Ele é a película externa da parte comestível do grão de trigo, retirado do grão no processo de refinamento industrial e que não é digerida pelo organismo humano (BUENO, 2014).

O farelo de trigo apresenta em sua composição 14% de proteínas, 6% de cinzas, 60% de carboidratos, além de fibras e compostos funcionais (FEDDERN; BADIALE-FURLONG; SOUZA-SOARES, 2007; SILVEIRA, 2007).

O biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* possui um grande potencial, uma vez que os custos de produção podem ser reduzidos, a partir do uso do substrato renovável, farelo de trigo, e também pela sua possível aplicação como emulsificante alimentício. Mas ainda são necessários estudos visando encontrar melhores condições de produção e também a cerca das propriedades do biossurfactante produzido.

3.4. Aplicação de biossurfactante na indústria de alimentos

Os biossurfactantes são uma classe de biocompostos que possuem ampla diversidade química, com propriedades para aplicações específicas. A aplicação comercial do biossurfactante determina-se pelo seu custo de produção e suas propriedades, em relação aos surfactantes sintéticos. A aplicação comercial dos biossurfactantes ainda não é competitiva devido aos altos custos de produção (RODRIGUES et al., 2006).

Os emulsificantes em alimentos tem o objetivo de promover a estabilidade da emulsão, que por definição é um sistema heterogêneo, consistindo de ao menos um líquido imiscível disperso em outro, em forma de pequenas gotas, mantendo controle sobre a aglomeração de glóbulos de gorduras e estabilização de sistemas aerados (BERNHEIMER; AVIGAD, 1970).

A propriedade de formação e estabilização de emulsões é a principal característica a ser influenciada pela adição de biossurfactantes em alimentos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, são creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, linguiça, sorvetes, bolos, chocolates (VELIKONJA; KOSARIC, 1993) e alimentos instantâneos.

Segundo Barros et al. (2007), também são descritas aplicações para emulsificantes como melhoradores da textura e vida de prateleira de produtos contendo amido, modificadores das propriedades reológicas da farinha de trigo, melhoria da consistência e textura de produtos à base de gorduras (KACHHOLZ; SCHINGMANN, 1987) e solubilização de aromas.

A aplicação de biossurfactantes em alimentos apresenta-se vantajosa uma vez que biossurfactantes podem ser produzidos a partir de fermentação, que é considerado um processo simples, e utilizando resíduos agroindustriais, reduzindo os custos de produção; devido a engenharia genética de micro-organismos, novos biossurfactantes podem ser facilmente sintetizados; não causam danos ao meio ambiente, uma vez que são de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade; diferentes propriedades do mesmo composto podem ser utilizadas para aplicações específicas, como a combinação do efeito emulsificante e antimicrobiano (HAFENBURG; HOMMEL; KLEBER, 2003) e pelo seu potencial de utilização como ingrediente com propriedade funcional (KIM et al., 1997).

Apesar da aplicação de biossurfactante se mostrar promissora em alimentos, ainda são necessários estudos para avaliar propriedades do biossurfactante, como questões nutricionais, funcionais, sensoriais, biológicas e toxicológicas; além dos requerimentos legais juntos aos órgãos regulamentadores de novos ingredientes.

Segundo relatos da literatura, sorofotolipídeos foram patenteados como aditivos para farinha de trigo (SHIGETA; YAMASHITA, 1986); parede celular de *Saccharomyces uvarum* hidrolisada e liofilizada aplicada em margarinas (OHATA;

KAMATA, 1986); ramnolípídeos de *Pseudomonas aeruginosa* para aplicações cosméticas e alimentícias (ISHIGAMI et al, 1988; LINHARDT et al., 1989).

Os ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* tem demonstrado alta produtividade para a produção de L-ramnose em escala comercial (DANIELS et al., 1988). Segundo Shepherd (1995), o biossurfactante produzido por *Candida utilis* aplicado como emulsificante em molhos para saladas mostrou-se promissor para ser utilizado como novo ingrediente para a indústria de alimentos.

Devido às propriedades da surfactina, literatura a cerca de sua aplicação na indústria de alimentos são escassos. Todavia, Costa (2005) relata que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* utilizando solução de 1,0 mg/mL de produto bruto em água, demonstrou capacidade de formar emulsões estáveis em óleos comestíveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

A cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* utilizada foi cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP).

4.1.1. Manutenção da cepa

O meio de manutenção do *Bacillus* foi o ágar nutriente, cuja fórmula é: 3,0 g/L de extrato de carne; 5,0 g/L de peptona de carne e 15 g/L de ágar, adicionado de meio mineral (40%, v/v) e estocado com temperatura a 4°C.

4.2. Esterilização dos meios

Para garantir as condições estéreis os meios líquidos, os substratos sólidos e os materiais utilizados foram esterilizados, em autoclave, a 121°C, 1,1 atm, durante 30 minutos, antes do início de qualquer procedimento.

4.3. Processo fermentativo e substrato

As fermentações para a produção de biossurfactantes foram conduzidas em estado sólido, onde foi utilizado o farelo de trigo como substrato.

4.3.1. Inóculo

O *Bacillus* foi inoculado por estrias, em esgotamento, em tubos inclinados de ágar nutriente e incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, foi realizada uma suspensão bacteriana, de cada tubo, utilizando água estéril.

A suspensão bacteriana foi utilizada como inóculo, quando a absorbância da suspensão celular, a 600 nm, encontrou-se entre 0,8 e 0,9 (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

4.3.2. Meio para fermentação em estado sólido

Os ensaios para fermentação em estado sólido foram realizados em sacos de polietileno, contendo 10 g do substrato farelo de trigo, comprado da empresa NATUS - Serviço Natus Centro de Alimentos Naturais em São José do Rio Preto – SP, e 2 mL de suspensão bacteriana.

O meio foi inoculado com 2 mL de suspensão bacteriana, juntamente com a solução umedecedora água estéril, até atingir teores de umidade desejados, além da solução indutora óleo residual de soja (coletado de residência em São José do Rio Preto), nas concentrações a serem testadas. Os meios foram incubados de acordo com o tempo e temperatura previamente estabelecidos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.3. Perfil de produção do biossurfactante em relação ao tempo

Para a obtenção do perfil de produção do biossurfactante em relação ao tempo foi realizada a curva de tensão superficial e índice de emulsificação em relação a 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de fermentação. Para a realização deste teste

preliminar foram padronizados 100% de umidade, 1 mL de solução indutora e incubados a 30°C.

4.3.4. Influência de metais na produção de biossurfactante

Para avaliar a influência de metais na produção de biossurfactante, foram realizadas fermentações com teores de sulfato de ferro, sulfato de sódio e sulfato de manganês, conforme o planejamento experimental apresentado na Tabela 3, a partir de um fatorial de 3³, em três níveis.

Tabela 3. Planejamento experimental fatorial de 3³, em três níveis, para avaliar a influência de manganês, ferro e sódio na produção de biossurfactante.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Teor de manganês (mmol L ⁻¹)	0,01	0,51	1,01
Teor de ferro (mmol L ⁻¹)	0,5	1,0	1,5
Teor de sódio (mmol L ⁻¹)	0,1	0,3	0,5

Fonte: Elaborado pela autora

4.3.5. Influência da concentração do indutor, umidade, tempo e temperatura na fermentação

Foram avaliados teores de umidade, concentração da solução indutora; temperatura de incubação, conforme descritos na Tabela 4, e também tempo de incubação, 24, 30 e 36 horas, com propósito de encontrar uma melhor condição para a produção do biossurfactante, de acordo com o Bueno (2014), visando a sua propriedade de emulsificação.

Um planejamento experimental foi realizado, por delineamento central composto rotacional, com as variáveis a serem analisadas descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento experimental, por delineamento central composto rotacional, para avaliar a influência da concentração do indutor, umidade, temperatura na

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Naturais		
	Conc. Indutor	Temperatura	Umidade	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)
1	1	1	1	1,3	36	112
2	-1	-1	-1	0,7	32	88
3	1	1	-1	1,3	36	88
4	1	-1	-1	1,3	32	88
5	-1	-1	1	0,7	32	112
6	-1	1	1	0,7	36	112
7	-1	1	-1	0,7	36	88
8	1	-1	1	1,3	32	112
9	1,68	0	0	1,5	34	100
10	0	1,68	0	1	37	100
11	0	-1,68	0	1	31	100
12	-1,68	0	0	0,5	34	100
13	0	0	1,68	1	34	120
14	0	0	-1,68	1	34	80
15	0	0	0	1	34	100
16	0	0	0	1	34	100
17	0	0	0	1	34	100

fermentação em 24, 30 e 36 horas de fermentação.

Fonte: Elaborado pela autora

4.4. Extração do biossurfactante

Para obter o extrato bruto de biossurfactante produzido, os cultivos foram interrompidos quando completaram o tempo de incubação estipulado no planejamento experimental e misturados com água destilada (1:5 m/v) por agitação, em um agitador orbital a 200 rpm, por 1 hora em temperatura ambiente, sendo a mistura, em seguida, filtrada a vácuo.

Os extratos resultantes foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C (DAS; MUKHERJEE, 2007). Para determinação tanto da produção de biossurfactante, como da tensão superficial e índice de emulsificação foram utilizados os sobrenadantes livres de células.

4.5. Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial foi realizada nos extratos livres de células, utilizando-se um tensiômetro Fisher Scientific – Surface Tensiomat 21.

As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de De Nöuy. A condição de análise padronizada para todos os ensaios foi: volume médio da amostra de 5 mL; e também foi necessário aguardar 30 minutos para iniciar a leitura.

4.6. Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado segundo a metodologia descrita por Iqbal et al. (1995). Em tubos de ensaio, foram adicionados 3,5 mL de tolueno e, posteriormente, 2 mL dos extratos livre de células.

Cada tubo foi submetido à agitação em vórtex, por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso e as medidas são realizadas após 24 horas; e o índice de emulsificação foi calculado através da relação matemática:

$$IE = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total do líquido}) \times 100$$

4.7. Purificação e quantificação do biossurfactante

O extrato livre de células foi acidificado, ajustando o pH em 2,0, utilizando 6N HCl, a 4°C por aproximadamente 12 horas, segundo Makkar; Cameotra (1999).

O biossurfactante precipitado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, depois suspenso em uma quantidade mínima de água destilada sendo colocado em placas de petri, com as massas previamente conhecidas e, em seguida, secas em estufa a 105°C, até peso constante.

O biossurfactante bruto produzido foi expresso em g/L.

4.8. Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada por análise de variância ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software Minitab 17 para verificar a influência isoladamente das variáveis temperatura, concentração do indutor e umidade.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil de produção do biossurfactante em relação ao tempo

Para iniciar o estudo da produção de biossurfactante, pelo *Bacillus amyloliquefaciens*, foram realizadas fermentações preliminares para conhecer o perfil de produção de biossurfactante em relação do tempo de fermentação.

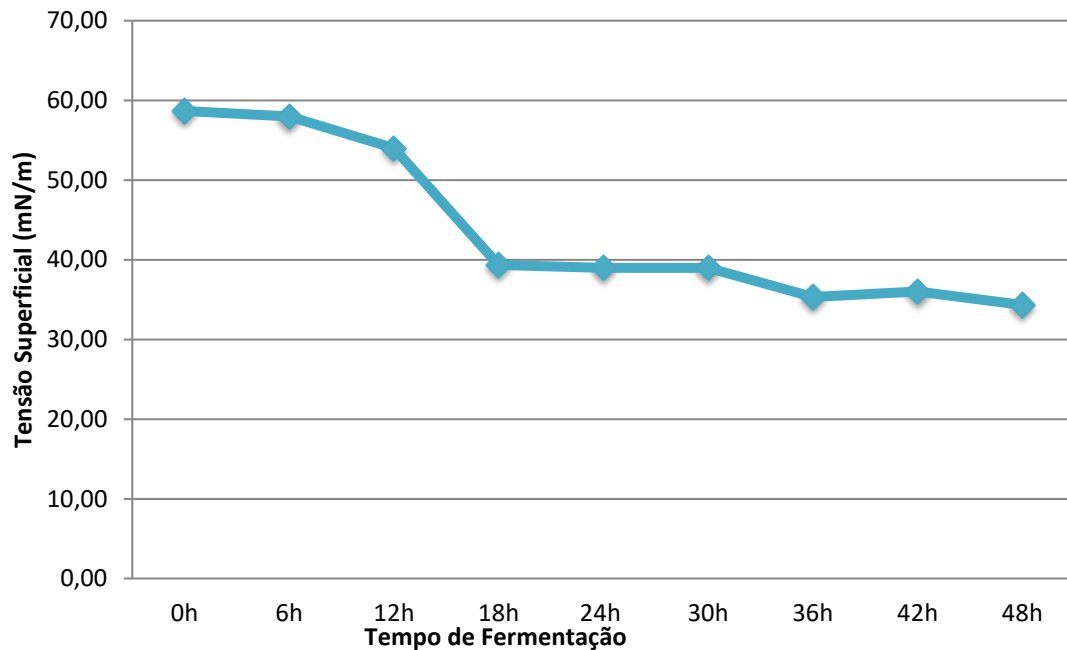
Bueno (2014), realizou um estudo com 48, 72 e 96 horas de fermentação, onde foi possível obter redução na tensão superficial do biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*.

A fim de complementar os estudos iniciados por Bueno (2014), foram analisadas as propriedades de tensão superficial e índice de emulsificação do biossurfactante, para 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de fermentação.

Para serem considerados bons produtores de biossurfactantes, micro-organismos devem reduzir a tensão superficial do sobrenadante em relação a da água abaixo de 40 mN/m e em torno de 35 mN/m (DESAI; BANAT, 1997).

De acordo com resultados de tensão superficial obtidos, nota-se que os melhores resultados foram a partir de 36 horas de fermentação, conforme Gráfico 1.

Gráfico 1. Medidas de tensão superficial nos diferentes tempos de fermentação.



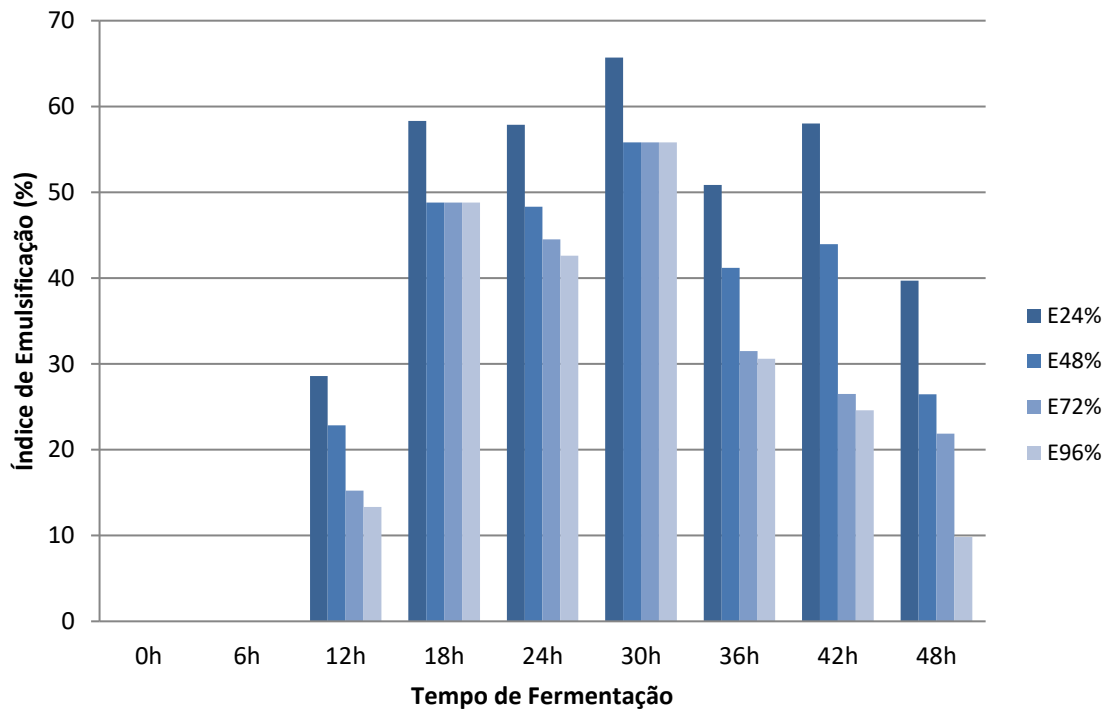
Fonte: Elaborado pela autora

As propriedades emulsificantes dos biossurfactantes são comumente discutidas em termos de atividade emulsificante, estabilidade da emulsão, capacidade emulsificante e/ou índice de emulsificação.

O critério utilizado para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactante, além da habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m e a capacidade de estabilização da emulsão, é sua habilidade em manter pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 horas depois da sua formação (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

Observou-se bons resultados de índice de emulsificação para os tempos de 18, 24, 30 e 42 horas, considerando o volume da emulsão 24 horas após sua formação e o tempo de 30 horas manteve acima de 50% do volume de emulsão original depois de 24, 48, 72 e 96 horas da formação, conforme Gráfico 2.

Após 30 horas foi observada uma redução em todos os índices de emulsificação. Sendo que o maior impacto negativo aconteceu no tempo de fermentação de 48 horas, com índice de emulsificação mensurado em 96%.

Gráfico 2. Medidas de índice de emulsificação nos diferentes tempos de fermentação.

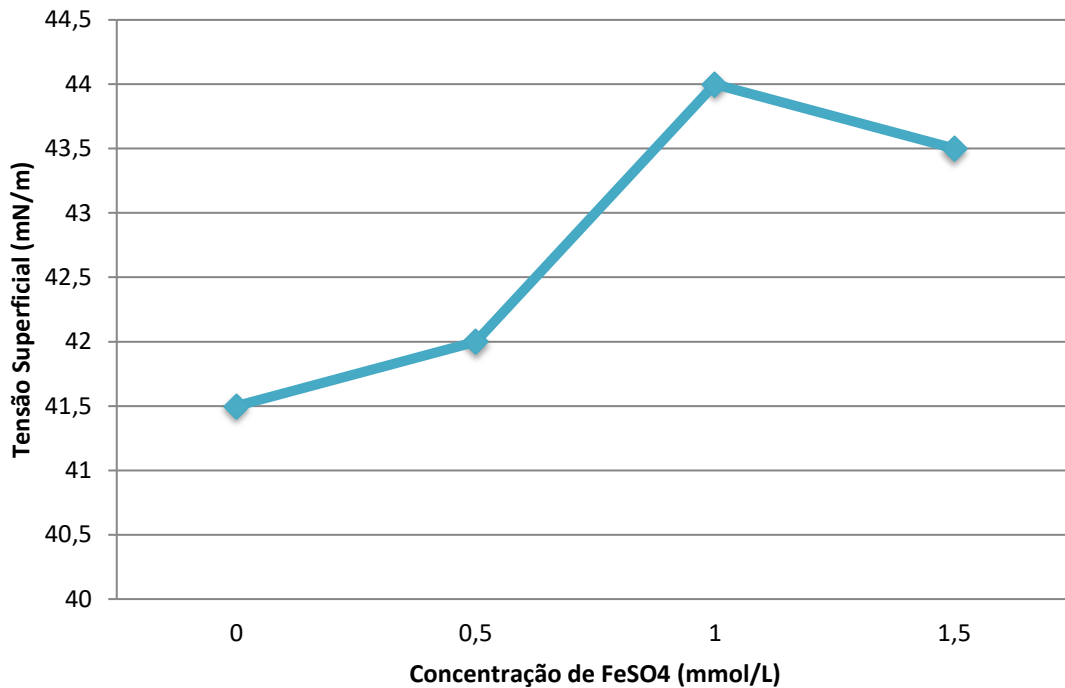
Fonte: Elaborado pela autora

5.2. Influência de metais na produção de biossurfactante

Para verificar a influência de concentrações de metais na produção do biossurfactante, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de sulfato de ferro, sulfato de sódio e sulfato de manganês, conforme o planejamento experimental fatorial de 3^3 . Uma fermentação padrão, sem o acréscimo de metais também foi realizada, par fins comparativos.

A Gráfico 3 apresenta as medidas de tensão superficial nas concentrações de 0,5 mmol/L, 1 mmol/L e 1,5 mmol/L de sulfato de ferro. Verificou-se que não há diferença entre os valores obtidos entre a fermentação que foi adicionada sulfato de ferro e a fermentação que não foi adicionada.

Gráfico 3. Medidas de tensão superficial em diferentes concentrações de sulfato de ferro e o padrão.

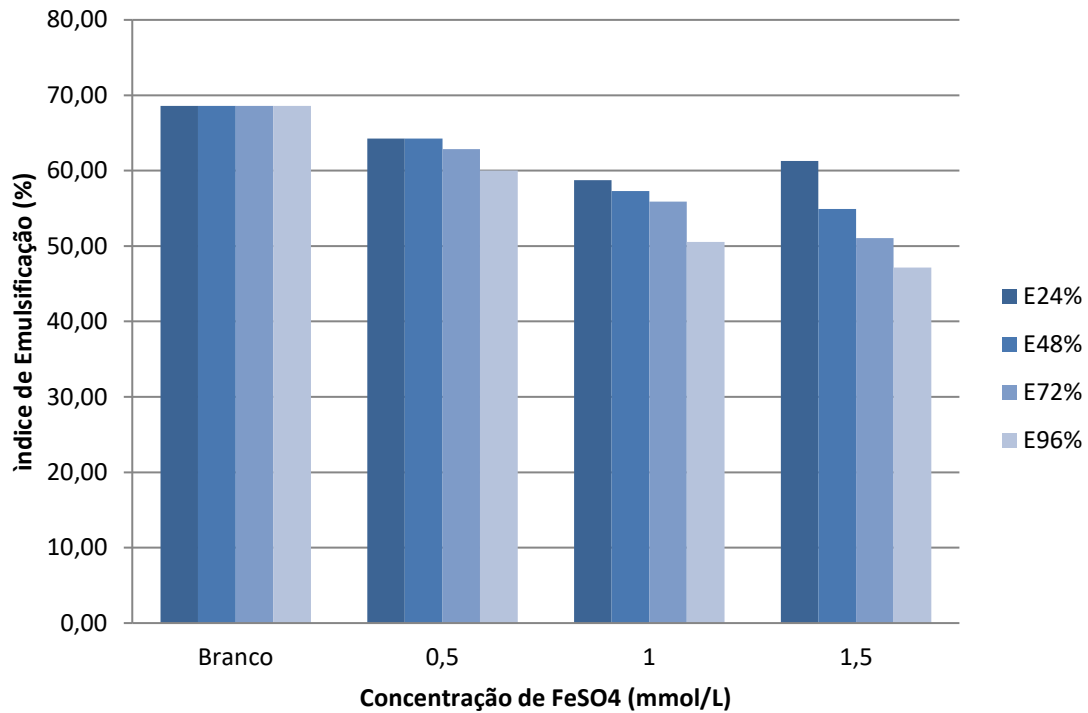


*Concentração 0 é equivalente à concentração padrão, sem a adição de ferro.

Fonte: Elaborado pela autora

Pode-se observar através do Gráfico 4 que após 24h, as melhores variáveis encontradas para estabilidade da emulsão, foram as de concentrações de 0,5 mmol/L e 1,5 mmol/L para o sulfato de ferro, que obtiveram valores acima de 60%, porém inferiores ao padrão, que chegou a quase 70%. Na concentração de 1 mmol/L, o valor situou-se acima de 50% da sua formação original, porém ainda abaixo da solução padrão analisada.

Gráfico 4. Medidas de índice de emulsificação para diferentes concentrações de sulfato de ferro e o padrão.

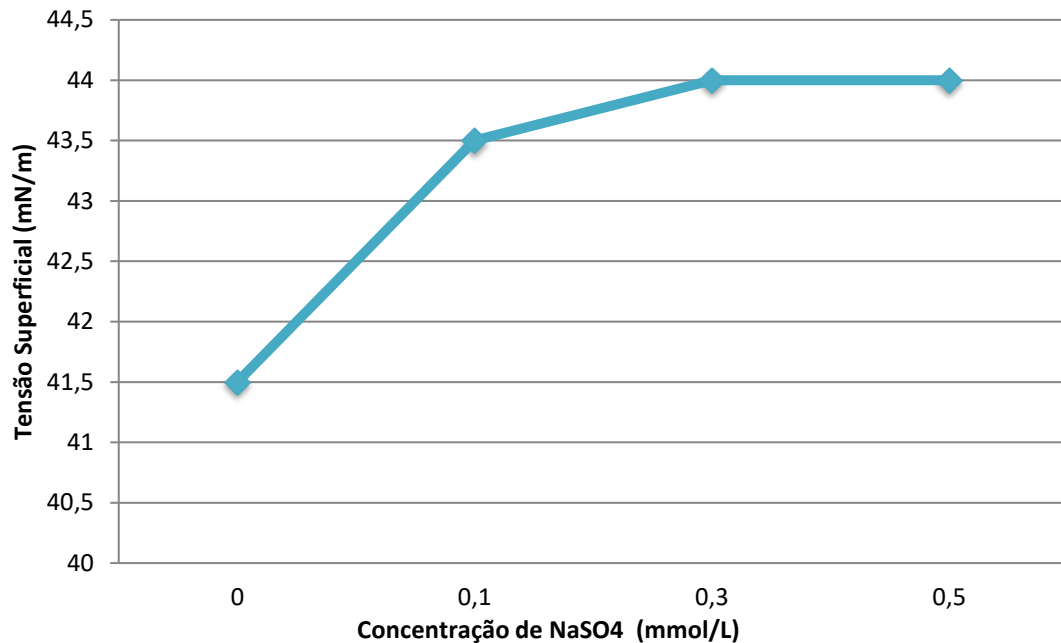


*Concentração Branco é equivalente à concentração padrão, sem a adição de ferro.

Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 5 apresenta as medições de tensão superficial nas concentrações de 0,1 mmol/L, 0,3 mmol/L e 0,5 mmol/L para o sulfato de sódio. Pode-se notar que, da mesma forma que a adição de ferro, não houve diferenças nos resultados entre as diferentes concentrações empregadas.

Gráfico 5. Medidas de tensão superficial em diferentes concentrações de sulfato de sódio e o padrão.



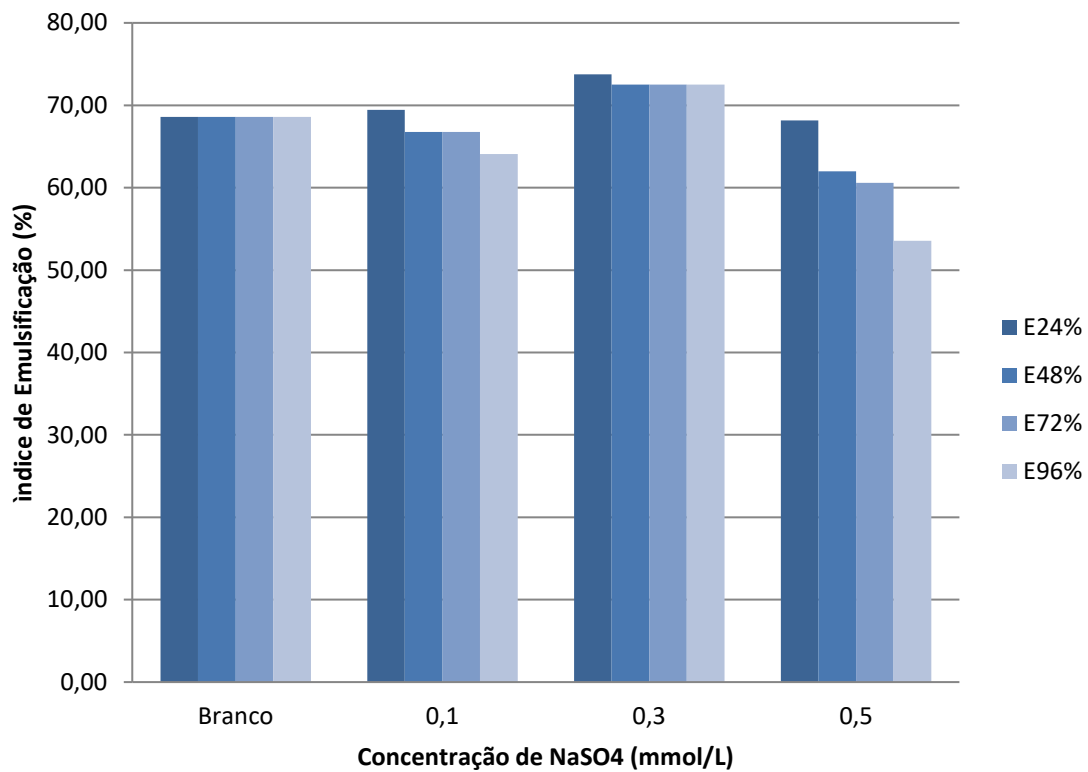
*Concentração 0 é equivalente à concentração padrão, sem a adição de sulfato de sódio.

Fonte: Elaborado pela autora

Para as diferentes concentrações de sulfato de sódio, pode-se observar pelo Gráfico 6, que após 24 horas, as concentrações 0,1 e 0,3 mmol/L obtiveram valores de índice de emulsificação acima dos valores obtidos pela fermentação sem adição de metais, auxiliando na manutenção da estabilidade do índice de emulsificação.

Porém, pode ser observada uma redução nos índices de emulsificação após 48 horas, equiparáveis à fermentação padrão, tornando-se ainda mais vantajosa a fermentação sem a adição de metais, pois manteve a estabilidade no índice de emulsificação de 24 até 96 horas e ainda torna o processo mais econômico, por não ser necessária componentes adicionais.

Gráfico 6. Medidas de índice de emulsificação em diferentes concentrações de sulfato de sódio e o padrão.

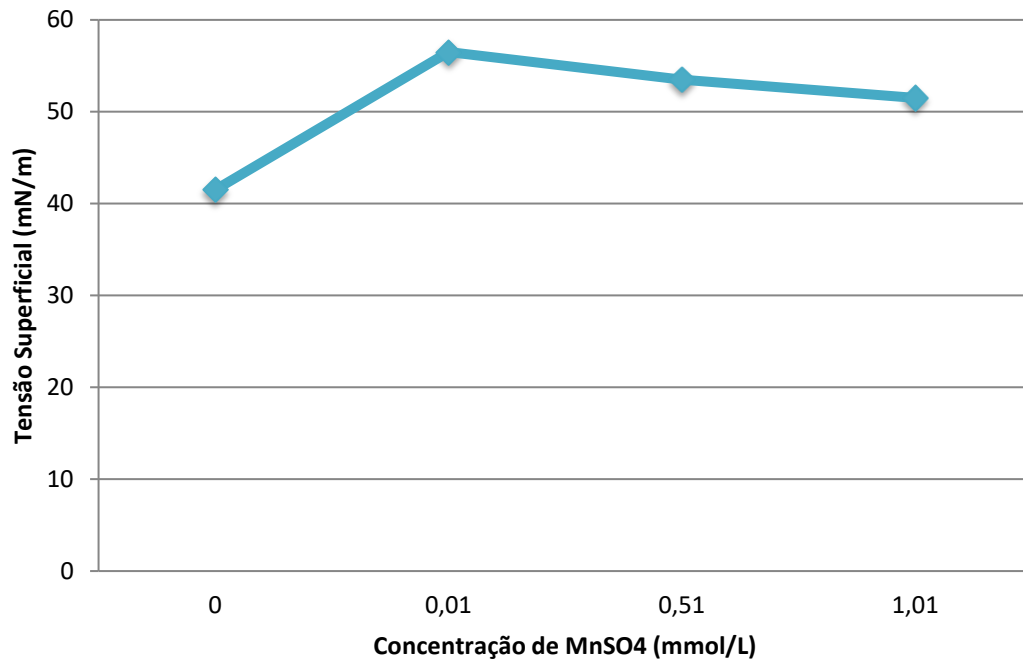


*Concentração Branco é equivalente à concentração padrão, sem a adição de sulfato de sódio.

Fonte: Elaborado pela autora

Mediante o Gráfico 7, pode-se observar que o sulfato de manganês apresentou um resultado negativo na tensão superficial, causando um aumento da tensão, quando comparada com a fermentação sem adição de metais.

Gráfico 7. Medidas de tensão superficial em diferentes concentrações de sulfato de manganês e o padrão.

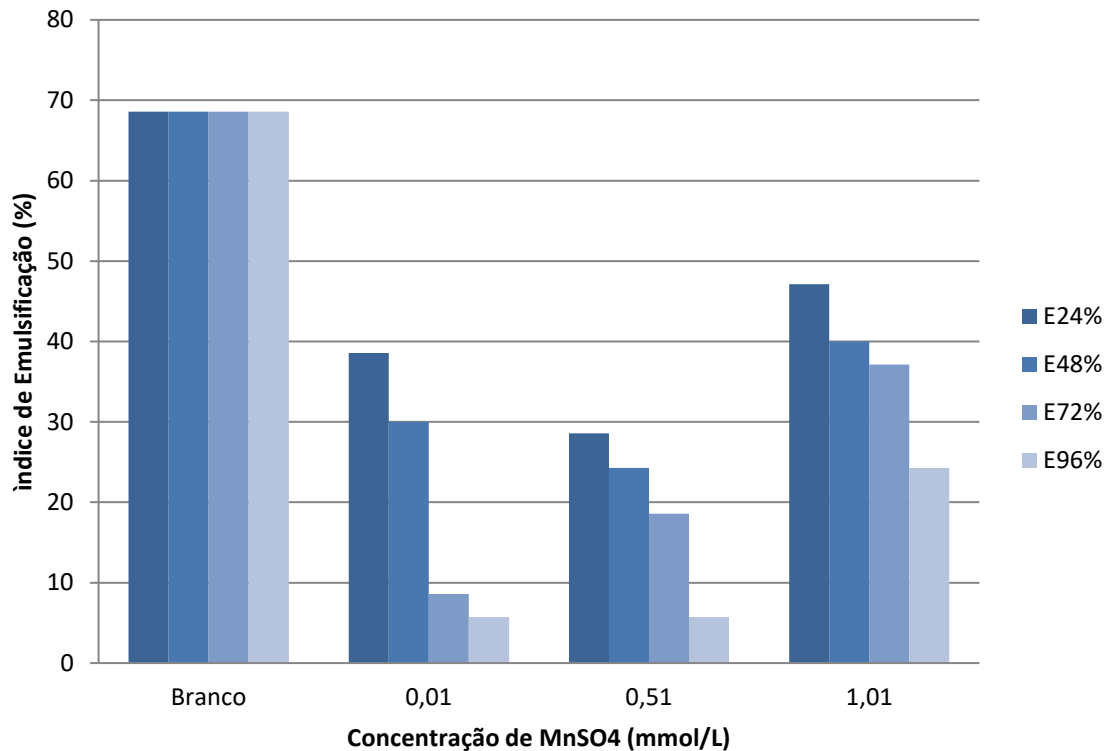


*Concentração 0 é equivalente à concentração padrão, sem a adição de sulfato de manganês.

Fonte: Elaborado pela autora

O sulfato de manganês também não apresentou efeito positivo na manutenção do índice de emulsificação. Mais uma vez, a fermentação sem adição de sulfato de manganês mostrou-se a emulsão mais estável, conforme Gráfico 8.

Gráfico 8. Medidas de índice de emulsificação para diferentes concentrações de sulfato de manganês e o padrão.

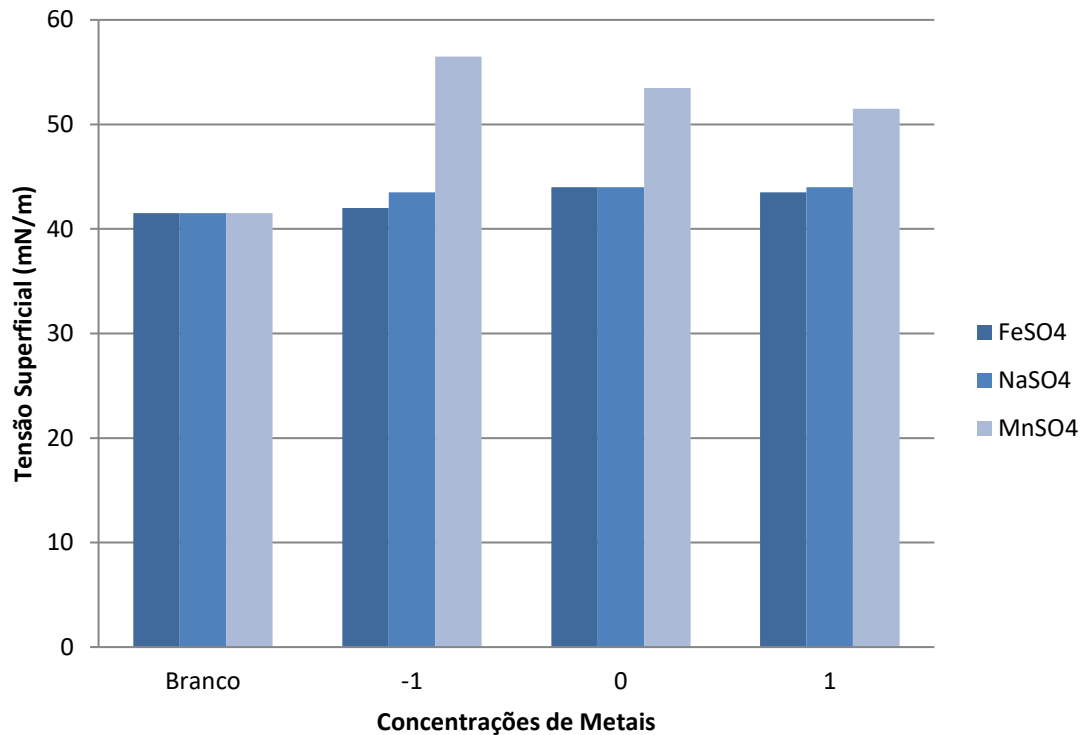


*Concentração Branco é equivalente à concentração padrão, sem a adição de sulfato de manganês.

Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 9 apresenta uma comparação dos valores obtidos para tensão superficial entre os metais sulfato de ferro, sulfato de sódio e sulfato de manganês, ambos comparados com uma fermentação padrão. Pode-se observar que todos os metais analisados nestes estudos aumentaram a tensão superficial, quando comparados com a fermentação padrão, sendo seu efeito negativo na redução da tensão superficial do biossurfactante.

Gráfico 9. Comparação entre o efeito dos metais FeSO_4 , NaSO_4 e MnSO_4 na tensão superficial e o padrão.



*Concentração Branco é equivalente à concentração padrão.

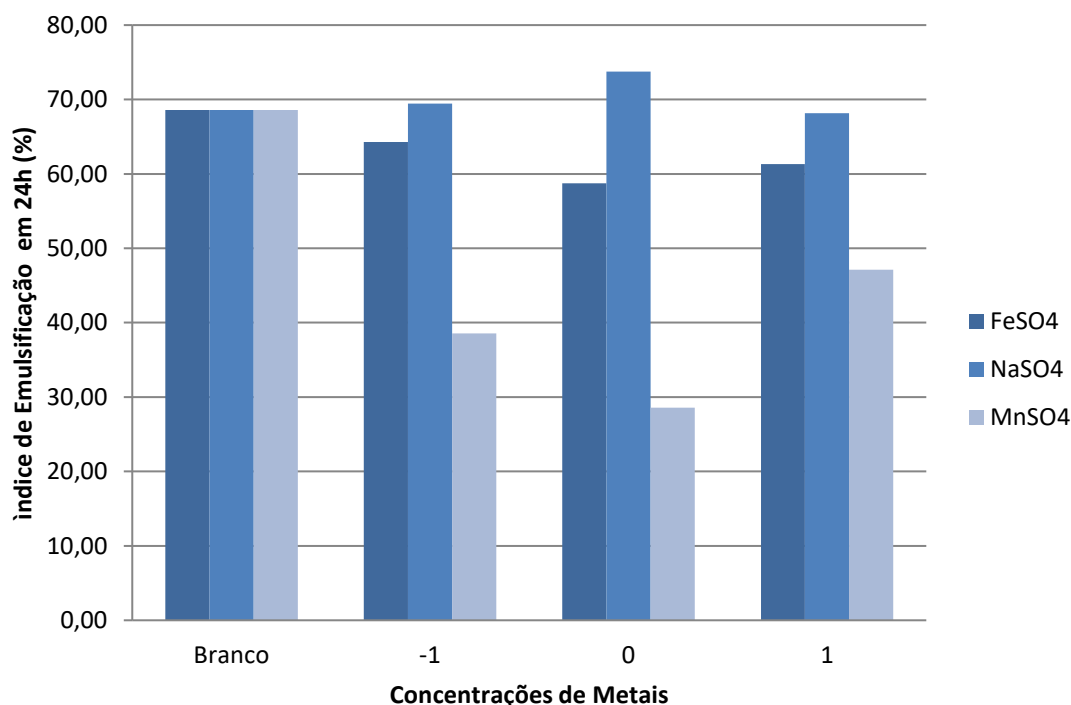
Fonte: Elaborado pela autora

O fato da tensão superficial não ter demonstrado diferença entre a fermentação sem adição de metais e as fermentações com diferentes concentrações de sulfato de ferro, sódio e zinco, pode ser explicada pelo fato de que o farelo de trigo já contém na sua composição uma certa quantidade desses metais, tanto de ferro quanto de sódio, e as concentrações adicionadas de metais não influenciaram na quantidade desses metais, já presentes no farelo.

Mediante a comparação dos resultados de índice de emulsificação com 24 horas, apresentados no Gráfico 10, pode-se notar a solução de sulfato de sódio, 0,1 e 0,3 mmol/L, destaca-se com índice de emulsificação superior ao obtido na fermentação sem adição de metais, quando comparado com o sulfato de ferro e sulfato de manganês. Porém, a emulsão não se manteve estável a partir de 48 horas e se equiparou com a fermentação padrão, conforme verificado anteriormente.

Desta forma, ainda é mais vantajoso do ponto de vista das propriedades de tensão superficial e índice de emulsificação, bem como do ponto de vista econômico, não adicionar metais à fermentação, quando utilizado farelo de trigo como substrato.

Gráfico 10. Comparação entre o efeito dos metais FeSO_4 , NaSO_4 e MnSO_4 no índice de emulsificação em 24 horas de fermentação e o padrão.



*Concentração Branco é equivalente à concentração padrão.

Fonte: Elaborado pela autora

5.3. Influência da concentração do indutor, umidade, temperatura em 24, 30 e 36 horas de fermentação

5.3.1. Fermentações realizadas em tempo de 24 horas

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriormente, foi levantada a hipótese de que explorando-se os tempos de fermentação 24, 30 e 36 horas, seriam obtidos melhores valores de índice de emulsificação.

Análise de tensão superficial também foi realizada para verificar o comportamento do biossurfactante, mediante esta propriedade, nos tempos de fermentação trabalhos.

Quando a fermentação foi interrompida em 24 horas, analisando os resultados de tensão superficial apresentados na Tabela 5, pode-se verificar que analisando individualmente cada variável, em geral, não apresentaram diferença significativa nos resultados de tensão superficial. Apenas os experimentos onde se trabalhou com

32°C apresentaram redução na tensão superficial, mas ainda estando longe do ideal, que é abaixo de 40 mN/m.

Tabela 5. Tensão superficial para biossurfactantes em 24 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tensão Superficial (mN/m)
1	1,3	36	112	51,5 Aabc
2	0,7	32	88	50,5 Aac
3	1,3	36	88	51,75 Aabc
4	1,3	32	88	52,5 Aac
5	0,7	32	112	50 Aac
6	0,7	36	112	51,5 Aabc
7	0,7	36	88	51,75 Aabc
8	1,3	32	112	51 Aac
9	1,5	34	100	52,75 Aabc
10	1	37	100	58 Aaa
11	1	31	100	55,5 Aaab
12	0,5	34	100	52,5 Aabc
13	1	34	120	52,25 Aabc
14	1	34	80	51 Aabc
15	1	34	100	51 Aabc
16	1	34	100	55 Aabc
17	1	34	100	52 Aabc

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

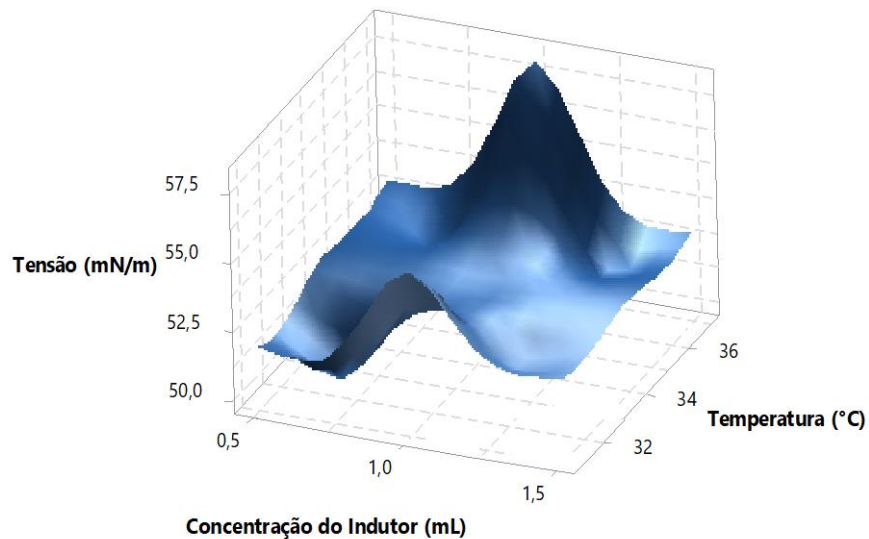
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade .

Fonte: Elaborado pela autora

Quando comparada a concentração do indutor e temperatura, conforme o Gráfico 11, pode-se observar que quando trabalhou-se com uma concentração de indutor e temperaturas mais baixas, foi obtida uma melhor redução na tensão superficial de 50 mN/m.

Gráfico 11. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para tensão superficial

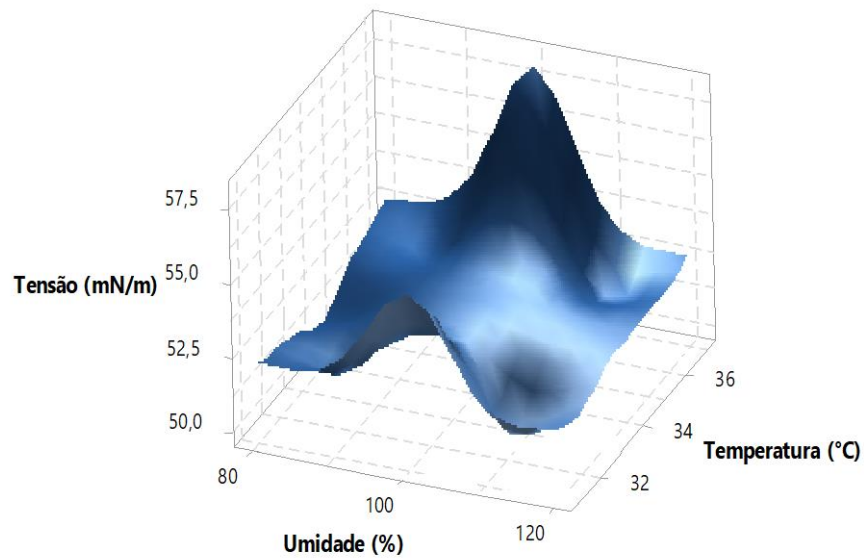


Fonte: Elaborado pela autora

Analisando a interação entre umidade e temperatura, conforme Gráfico 12, nota-se que a combinação de alta temperatura e uma umidade de 100% afeta negativamente a tensão superficial, resultando em uma tensão de 57 mN/m.

Gráfico 12. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e umidade em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para tensão superficial

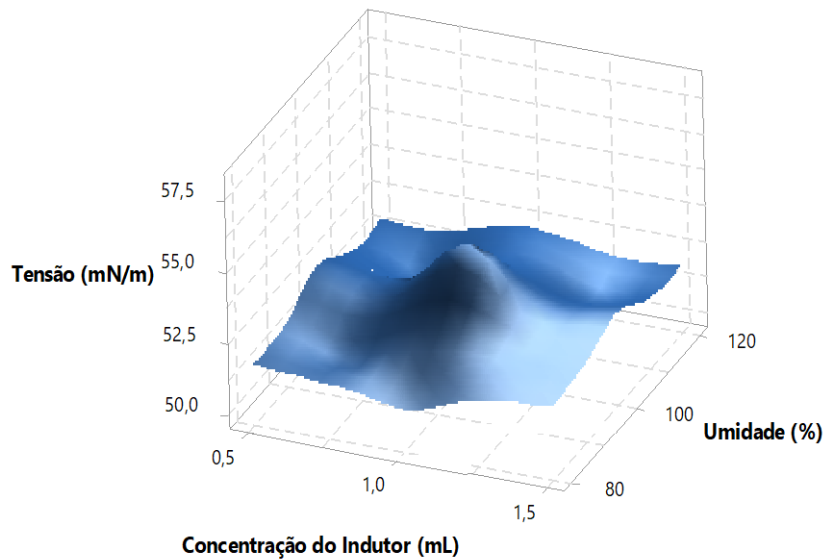


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 13 mostra que os melhores valores de redução na tensão superficial foram obtidos quando trabalhou-se com a menor concentração do indutor, sendo independente da umidade. Desta forma, é interessante considerar a menor umidade, visando economia no processo.

Gráfico 13. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para tensão superficial



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 6 apresenta os resultados de índice de emulsificação (24E), para as fermentações que foram finalizadas em 24 horas. Mediante os dados obtidos, nota-se que não houve diferença significativa entre os resultados de índice de emulsificação para as variáveis de concentração do indutor, temperatura e umidade. Os únicos experimentos que mantiveram pelo menos 50% do volume de emulsão original foram 1 (62,37%), 7 (50%) e 17 (54%).

Tabela 6. Índice de emulsificação para o biossurfactante obtido em 24 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Índice de Emulsificação (%)
1	1,3	36	112	62,37Aaa
2	0,7	32	88	33,96Aaa
3	1,3	36	88	46,24Aaa
4	1,3	32	88	30Aaa
5	0,7	32	112	0Aaa
6	0,7	36	112	39,75Aaa
7	0,7	36	88	50Aaa
8	1,3	32	112	49,93Aaa
9	1,5	34	100	38,18Aaa
10	1	37	100	0Aaa
11	1	31	100	28,75Aaa
12	0,5	34	100	24,31Aaa
13	1	34	120	21,43Aaa
14	1	34	80	27,81Aaa
15	1	34	100	27,96Aaa
16	1	34	100	43,83Aaa
17	1	34	100	54,14Aaa

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

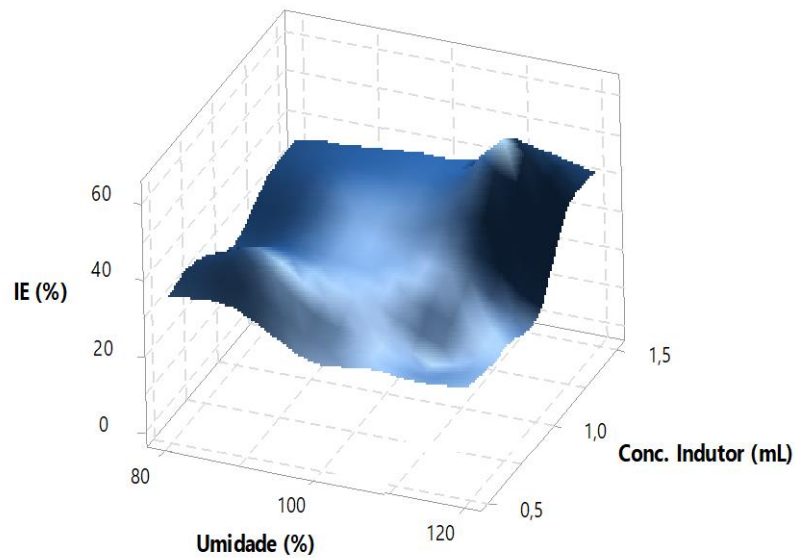
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade

Fonte: Elaborado pela autora.

O Gráfico 14 apresenta maiores valores de índice de emulsificação quando combinados 80% de umidade e 0,5 mL de concentração do indutor (62,37%).

Gráfico 14. Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para índice de emulsificação

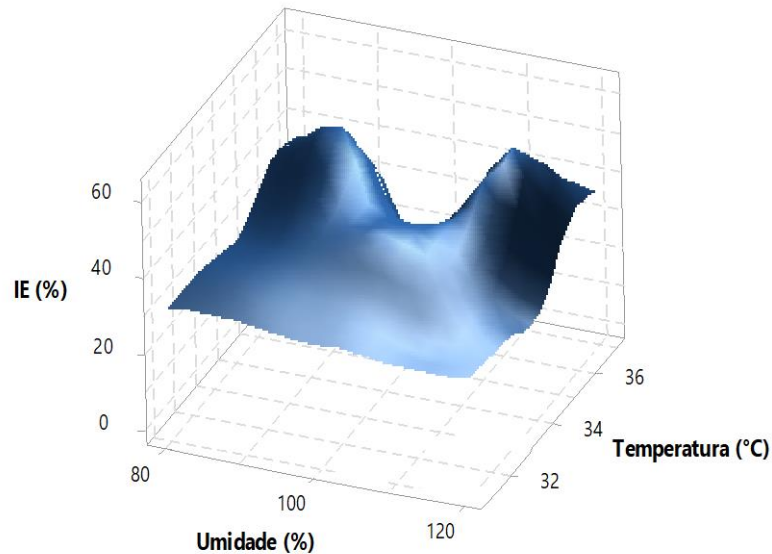


Fonte: Elaborado pela autora

Observando o Gráfico 15 nota-se que as combinações temperatura elevada nas umidades de 80 e 120% resultaram em um bom índice de emulsificação. Todavia a uma umidade de 100%, houve impacto negativo no índice de emulsificação.

Gráfico 15. Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada com a umidade e temperatura em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para índice de emulsificação

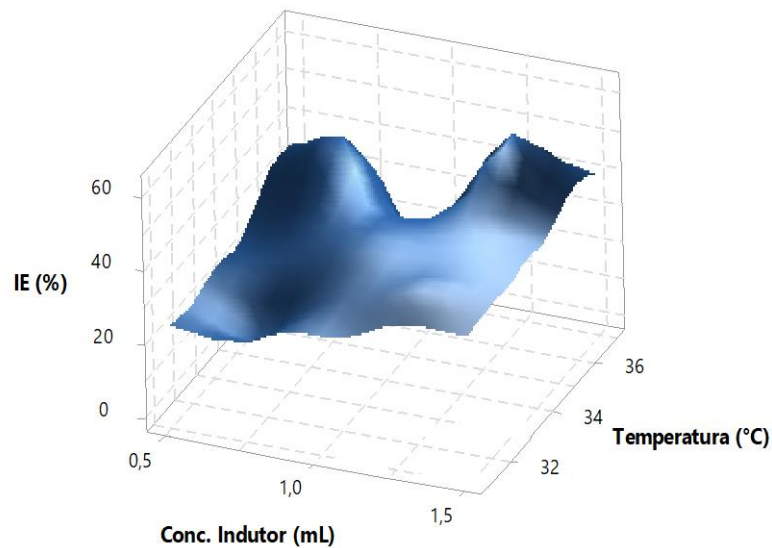


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 16 apresenta os resultados de índice de emulsificação quando combinados concentração do indutor+temperatura. Nota-se que as combinações elevada concentração de indutor+elevada temperatura afetou positivamente o índice de emulsificação. Mas, quando combinados baixa temperatura+baixa concentração de indutor, um efeito negativo na emulsificação foi observado. O efeito negativo foi observado também para 37°C e 1 mL de indutor.

Gráfico 16. Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada com a concentração do indutor e temperatura em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para índice de emulsificação



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 7 mostra que não houve diferença significativa entre as variáveis concentração do indutor, temperatura e umidade para a produção de biossurfactante (g/L), para fermentação durante 24 horas.

Tabela 7. Produção de biossurfactantes produzidos por em 24 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Produção (g/L)
1	1,3	36	112	2,24 Aaa
2	0,7	32	88	2,045 Aaa
3	1,3	36	88	2,22 Aaa
4	1,3	32	88	2,15 Aaa
5	0,7	32	112	2,31 Aaa
6	0,7	36	112	2,42 Aaa
7	0,7	36	88	2,29 Aaa
8	1,3	32	112	2,34 Aaa
9	1,5	34	100	2,19 Aaa
10	1	37	100	2,08 Aaa
11	1	31	100	2,17 Aaa
12	0,5	34	100	2,15 Aaa
13	1	34	120	2,26 Aaa
14	1	34	80	2,145 Aaa
15	1	34	100	2,33 Aaa
16	1	34	100	2,3 Aaa
17	1	34	100	2,36 Aaa

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

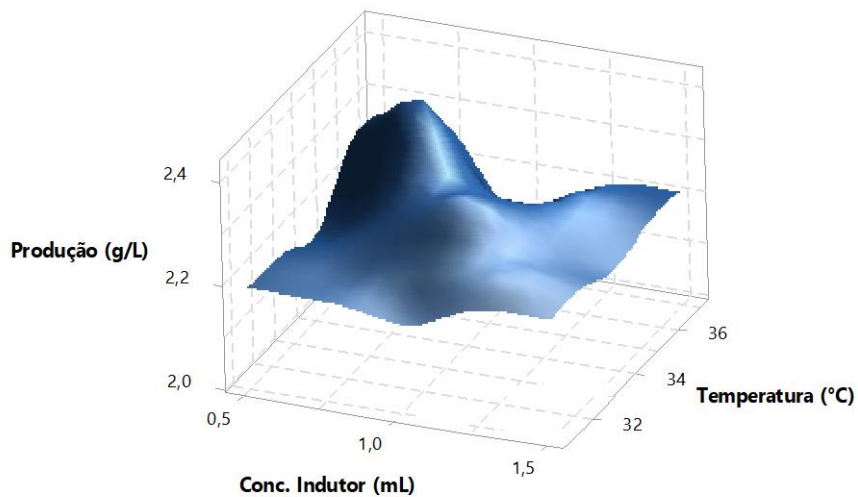
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade .

Fonte: Elaborado pela autora

Mediante o Gráfico 17, pode-se observar que a produção de biossurfactante é maior quando combinada uma menor concentração do indutor e uma maior temperatura (2,42 g/L).

Gráfico 17. Superfície ajustada para a produção quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para produção

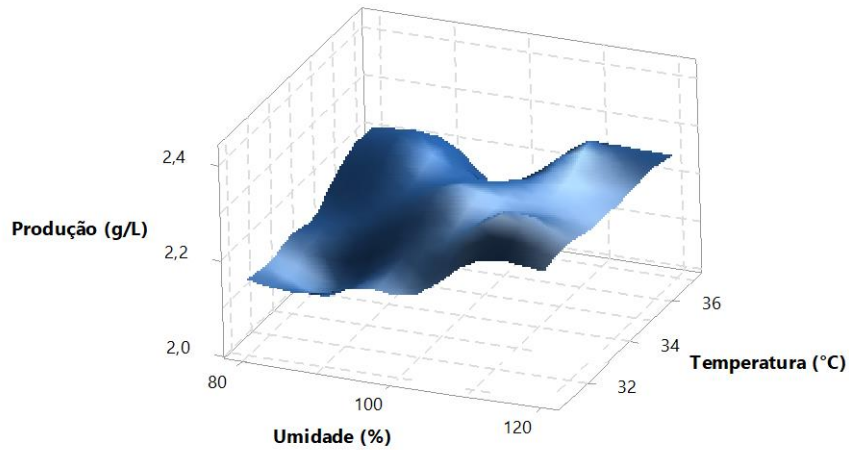


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 18 apresenta resultados de produção de biossurfactante quando combinadas as variáveis umidade+temperatura. Pode-se observar que concentração elevadas de umidade à baixa temperatura de fermentação proporciona uma maior produtividade (2,42 g/L).

Gráfico 18. Superfície ajustada para a produção quando comparada com a temperatura e umidade em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção

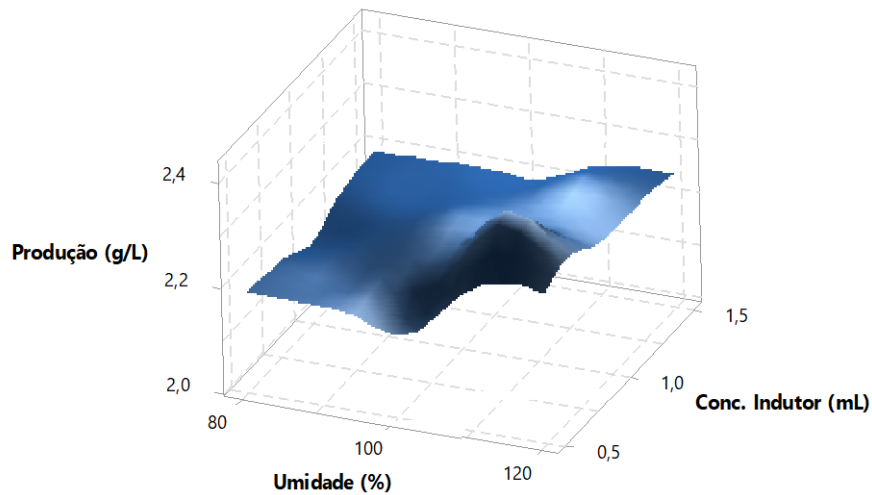


Fonte: Elaborado pela autora

No Gráfico 19 nota-se que a combinação de uma elevada umidade e baixa concentração do indutor também proporcionou valores elevados de produção de biossurfactante em 24 horas de fermentação (2,42 g/L).

Gráfico 19. Superfície ajustada para a produção quando comparada com a concentração do indutor e umidade em 24 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção



Fonte: Elaborado pela autora

5.3.2. Fermentações realizadas em tempo de 30 horas

A Tabela 8 apresenta os resultados de tensão superficial do biossurfactante em 30 horas de fermentação. Pode-se observar que as variáveis concentração do indutor, temperatura e umidade não apresentaram diferença significativa. Os experimentos que apresentaram maior redução na tensão superficial foram 2 (50 mN/m) e 5 (50,5 mN/m).

Tabela 8. Tensão superficial do biossurfactante em 30 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tensão Superficial (mN/m)
1	1,3	36	112	57 Aaa
2	0,7	32	88	50 Aaa
3	1,3	36	88	55,5 Aaa
4	1,3	32	88	53,5 Aaa
5	0,7	32	112	50,5 Aaa
6	0,7	36	112	56 Aaa
7	0,7	36	88	51 Aaa
8	1,3	32	112	51,75 Aaa
9	1,5	34	100	53 Aaa
10	1	37	100	55 Aaa
11	1	31	100	55,5 Aaa
12	0,5	34	100	52,75 Aaa
13	1	34	120	54 Aaa
14	1	34	80	53 Aaa
15	1	34	100	51,5 Aaa
16	1	34	100	52,5 Aaa
17	1	34	100	52 Aaa

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

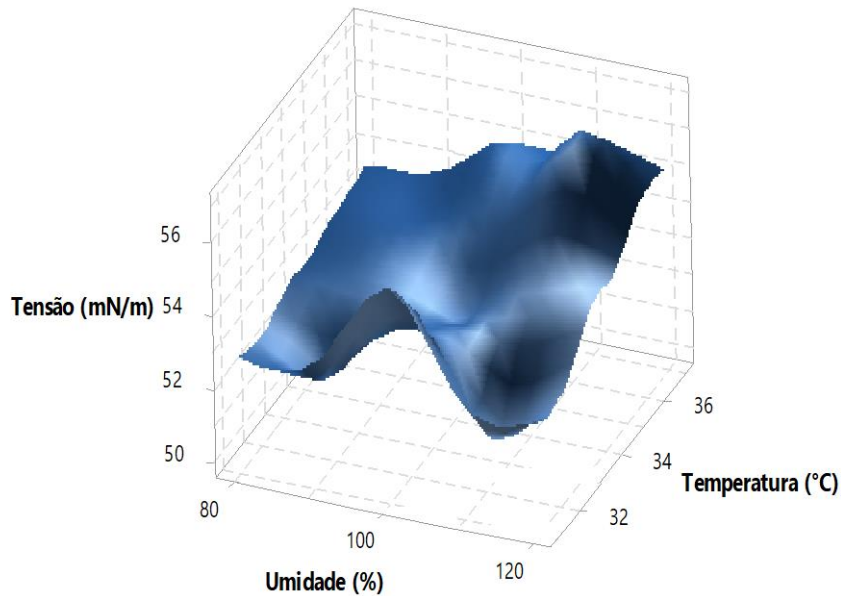
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade .

Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 20 apresenta os resultados de tensão superficial quando combinadas as variáveis umidade e temperatura, onde foi possível observar que os melhores valores de redução na tensão superficial foram obtidos quando combinados tanto baixa ou elevada umidade à uma baixa temperatura.

Gráfico 20. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparadas a umidade e a temperatura em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a tensão

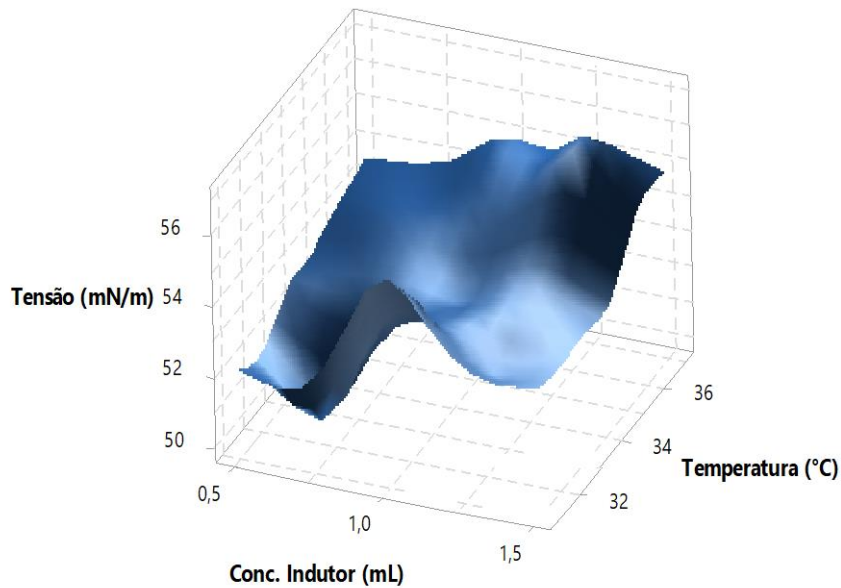


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 21 demonstra os resultados de tensão superficial, quando combinados temperatura e concentração do indutor, para 30 horas de fermentação. Nota-se que o resultado que apresentou uma influência negativa na redução da tensão superficial foi quanto trabalhou-se com 1,3 mL do indutor+32°C, 57 mN/m e a melhor redução da tensão superficial foi com 0,7 mL do indutor+32°C, com valor de 50 mN/m.

Gráfico 21. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparadas a concentração do indutor e a temperatura em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a tensão

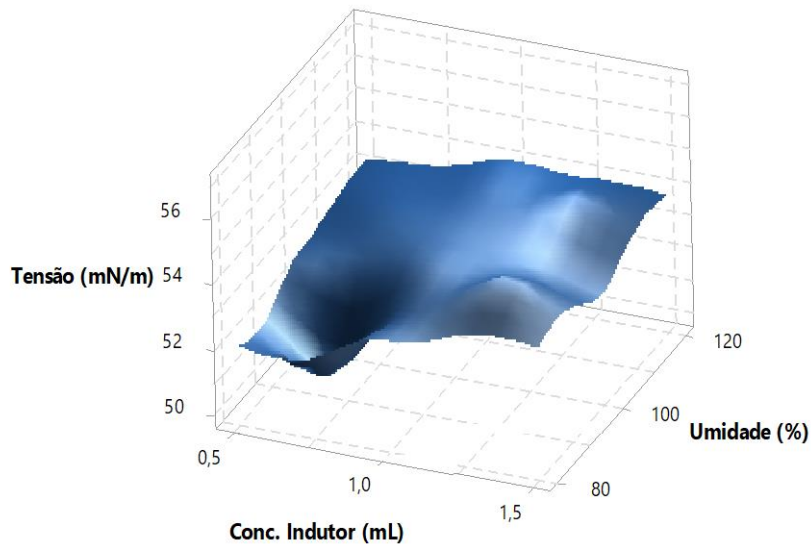


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 22 apresenta os resultados de tensão superficial quando combinadas as variáveis concentração do indutor e umidade. Pode ser observado que trabalhar com uma baixa concentração de indutor e uma baixa umidade proporciona uma boa redução na tensão superficial.

Gráfico 22. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparadas a concentração do indutor e a umidade em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a tensão



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 9 mostra que houve diferença significativa para o índice de emulsificação, em 30 horas de fermentação, apenas para a variável temperatura.

Os experimentos 1 (59,03%), 3 (58,21%), 7 (56,08%), 8 (56,53%), 9 (54,46%), 10 (58,95%), 11 (65,97%), 12 (55,78%), 13 (50,75%), 14 (54,25%), 15 (52,03%) e 17 (55,13%) apresentaram capacidade de estabilização da emulsão em pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 horas depois da sua formação, podendo ser considerados bons emulsificantes (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

Tabela 9. Índice de emulsificação do biossurfactante em 30 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Índice de Emulsificação (%)
1	1,3	36	112	59,03 Aaa
2	0,7	32	88	0 Aba
3	1,3	36	88	58,21 Aaa
4	1,3	32	88	7,14 Aba
5	0,7	32	112	7,69 Aba
6	0,7	36	112	49,21 Aaa
7	0,7	36	88	56,08 Aaa
8	1,3	32	112	56,53 Aba
9	1,5	34	100	54,46 Aaa
10	1	37	100	58,95 Aaba
11	1	31	100	65,97 Aaa
12	0,5	34	100	55,78 Aaa
13	1	34	120	50,75 Aaa
14	1	34	80	54,25 Aaa
15	1	34	100	52,03 Aaa
16	1	34	100	48,53 Aaa
17	1	34	100	55,13 Aaa

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

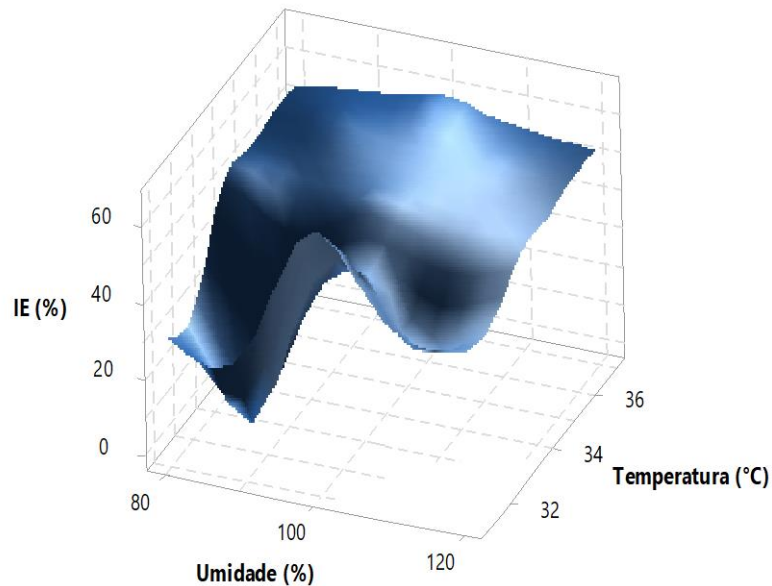
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade .

Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 23 apresenta que altas temperaturas levam aos melhores resultados de índice de emulsificação. E a tendência do índice foi baixa quando combinados os fatores baixa temperatura+baixa umidade.

Gráfico 23. Superfície ajustada para a índice de emulsificação quando comparada com a temperatura e umidade em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para o índice de emulsificação

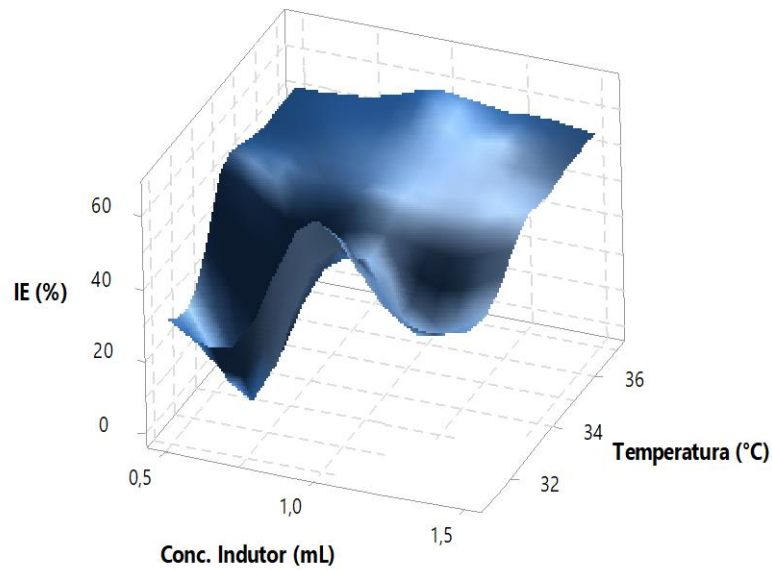


Fonte: Elaborado pela autora

Valores mais altos de índice de emulsificação foram obtidos quando combinadas elevadas temperaturas, independente da concentração do indutor. Mas, quando trabalhou-se com temperatura baixas, apenas concentrações em torno de 1 mL demonstraram melhores índices de emulsificação, conforme o Gráfico 24.

Gráfico 24. Superfície ajustada para a índice de emulsificação quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para o índice de emulsificação

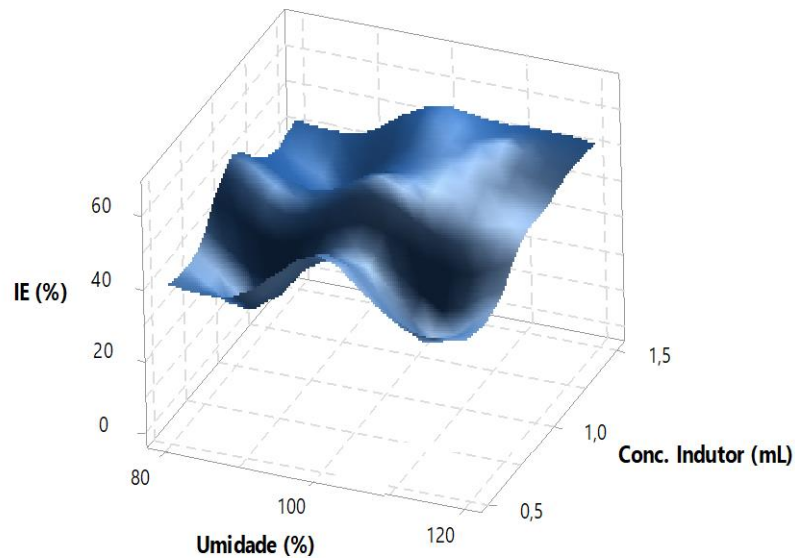


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 25 mostra que quando os melhores índices de emulsificação foram obtidos a 100% de umidade, não havendo influência da concentração do indutor para essa condição.

Gráfico 25. Superfície ajustada para a índice de emulsificação quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para o índice de emulsificação



Fonte: Elaborado pela autora

Conforme a Tabela 10, pode-se verificar que houve diferença significativa na produção de biossurfactante apenas para a variável temperatura. O maior valor de produção de biossurfactante foi de 6,30 g/L, enquanto o menor valor foi de 1,74 g/L.

Tabela 10. Produção de biossurfactante em 30 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Produção (g/L)
1	1,3	36	112	4,67 Aa a
2	0,7	32	88	2,255 Aca
3	1,3	36	88	2,415 Aa a
4	1,3	32	88	2,005 Aca
5	0,7	32	112	2,105 Aca
6	0,7	36	112	3,87 Aa a
7	0,7	36	88	6,305 Aa a
8	1,3	32	112	2,24 Aca
9	1,5	34	100	2,065 Abca
10	1	37	100	2,11 Aabca
11	1	31	100	4,705 Aabca
12	0,5	34	100	2,22 Abca
13	1	34	120	1,745 Abca
14	1	34	80	2,1 Abca
15	1	34	100	2,24 Abca
16	1	34	100	2,485 Abca
17	1	34	100	2,17 Abca

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

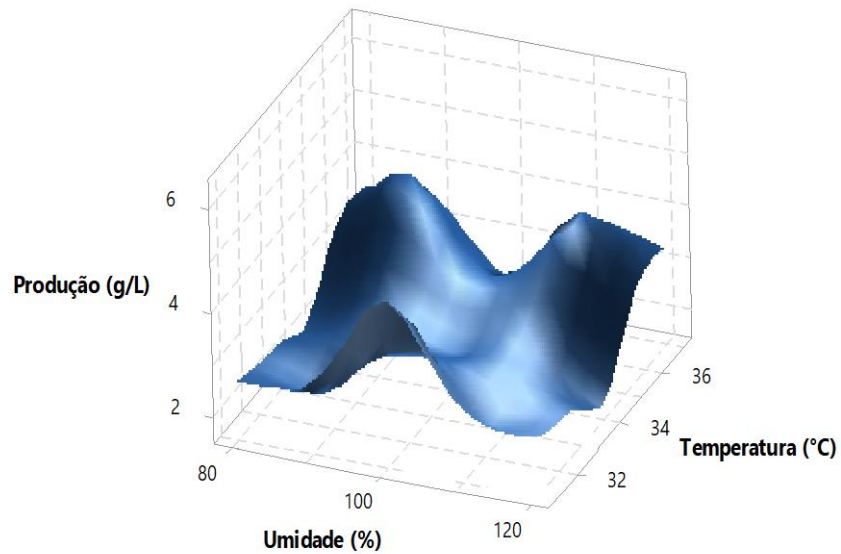
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade .

Fonte: Elaborado pela autora

Conforme o Gráfico 26, a temperatura de 36C foi a melhor de condição para produção de biossurfactante, quando combinada com 88% e 112% de umidade.

Gráfico 26. Superfície ajustada para a produção quando comparada com a umidade e temperatura em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção

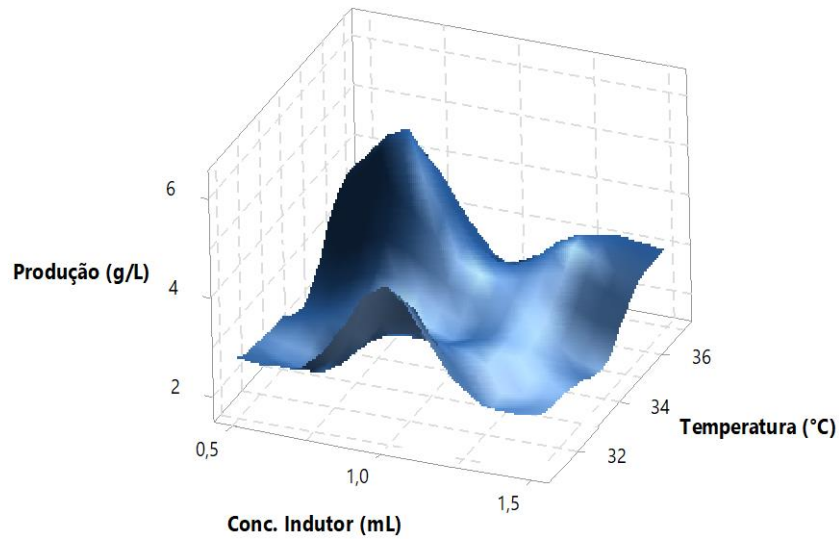


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 27 mostra que maiores produções de biossurfactante foram obtidas em fermentações com menores concentrações de indutor, em condição de temperaturas elevadas.

Gráfico 27. Superfície ajustada para a produção quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção

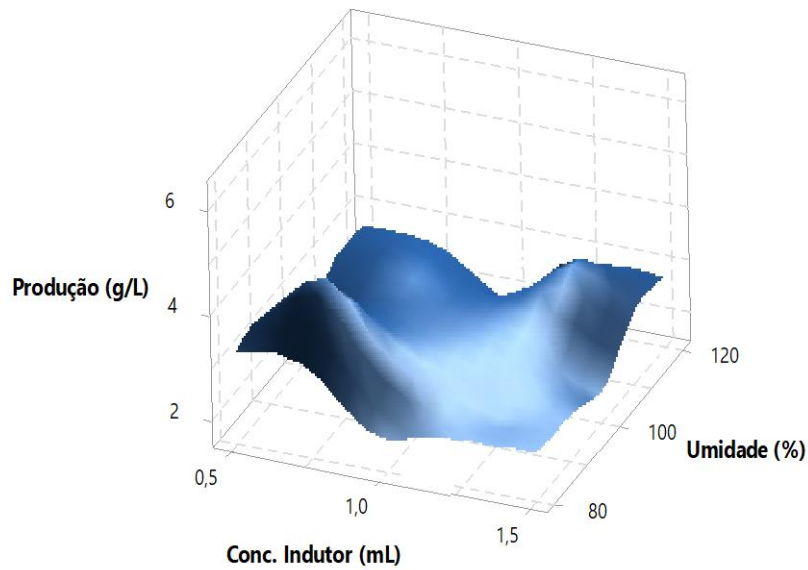


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 28 mostra que a melhor combinação para a produção de biossurfactante foi baixa umidade, em uma condição de baixa concentração de indutor.

Gráfico 28. Superfície ajustada para a produção quando comparada com a umidade e concentração do indutor em 30 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção



Fonte: Elaborado pela autora

5.3.3 Fermentações realizadas em tempo de 48 horas.

A Tabela 11 mostra que houve diferença significativa apenas para a variável temperatura, estando relacionada a maior redução de tensão superficial à 31°C, 48 nM/m, e a maior tensão superficial à 36°C, 57,5.

Tabela 11. Tensão superficial em 36 horas de fermentação

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tensão (mN/m)
1	1,3	36	112	56,5 Aaa
2	0,7	32	88	50 Aba
3	1,3	36	88	57,5 Aaa
4	1,3	32	88	51 Aba
5	0,7	32	112	50,5 Aba
6	0,7	36	112	55 Aaa
7	0,7	36	88	54 Aaa
8	1,3	32	112	52 Aba
9	1,5	34	100	52 Aba
10	1	37	100	50,5 Aba
11	1	31	100	48 Aba
12	0,5	34	100	53 Aba
13	1	34	120	51,5 Aba
14	1	34	80	49 Aba
15	1	34	100	50,5 Aba
16	1	34	100	50,5 Aba
17	1	34	100	52 Aba

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

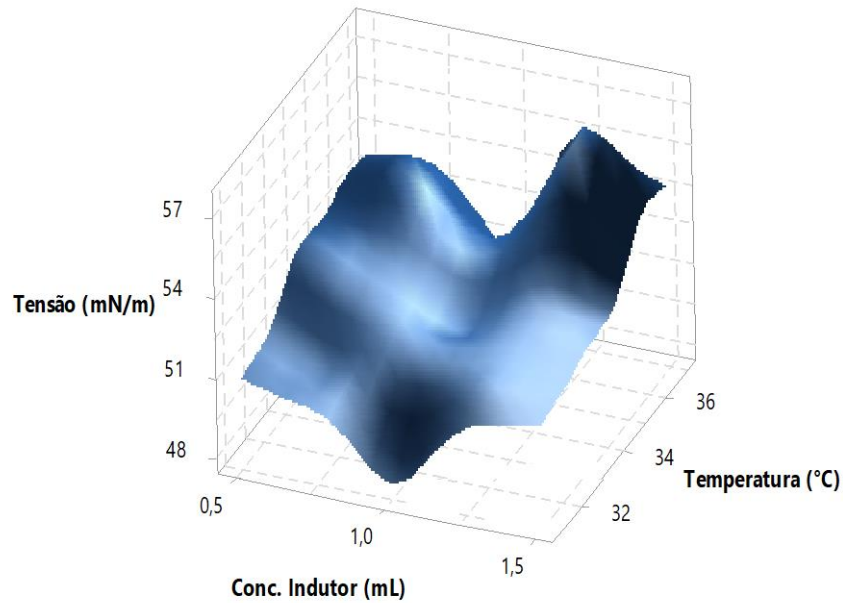
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade

Fonte: Elaborado pela autora .

Conforme o Gráfico 29, bons valores de redução de tensão superficial podem ser obtidos quando combinadas as variáveis 1 mL de indutor, a temperatura de 31°C, 48 mN/m. O mesmo não pode ser observado quando combinadas as variáveis 36°C+1,3 mL de indutor, causando um efeito negativo na redução da tensão superficial em 36 horas de fermentação.

Gráfico 29. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e concentração do indutor em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a tensão

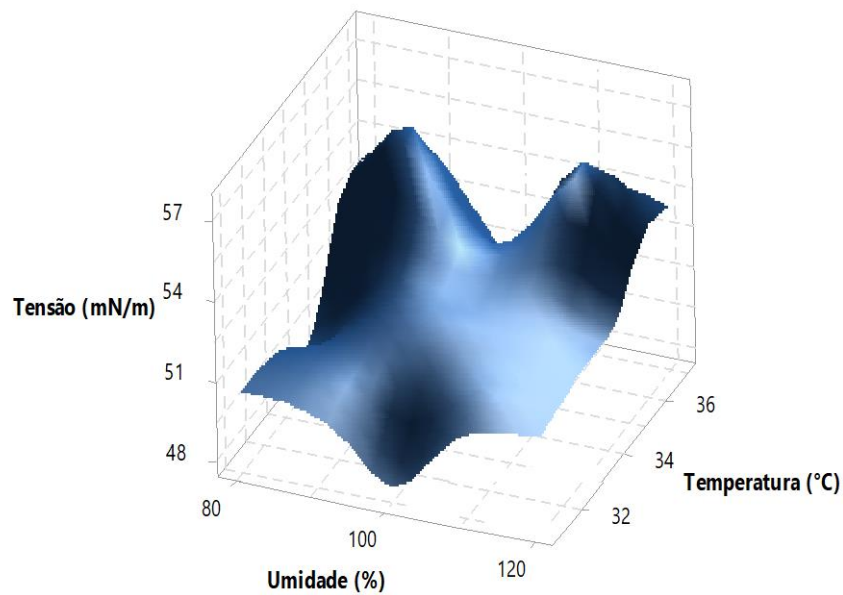


Fonte: Elaborado pela autora

No Gráfico 30 observa-se que quando trabalhado com elevadas temperaturas, apenas utilizando uma concentração em torno de 100% de umidade, pode-se reduzir a tensão superficial. No entanto, quando se reduziu a temperatura melhores reduções de tensão foram obtidas, principalmente abaixo de 100% de umidade. A combinação de uma menor umidade e temperatura mais baixa pode trazer economia para o processo.

Gráfico 30. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a temperatura e umidade em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a tensão

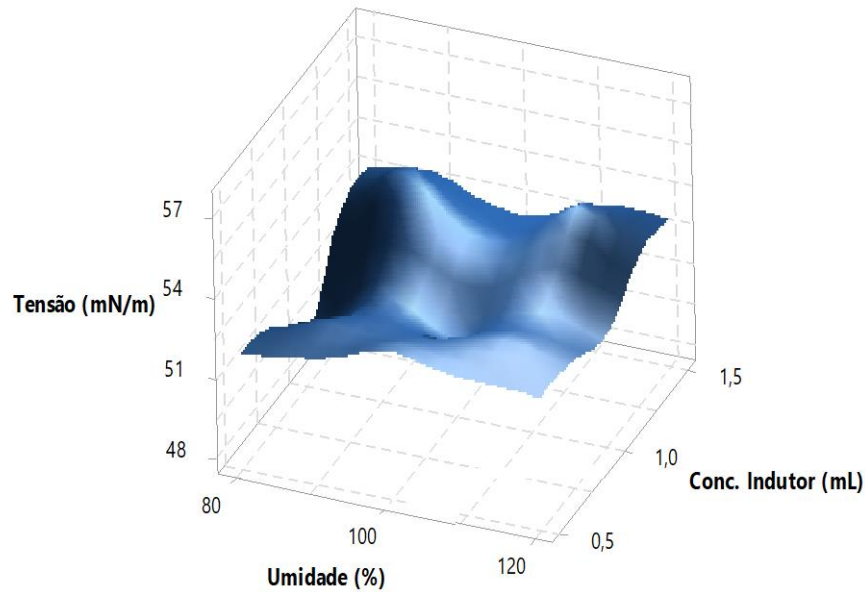


Fonte: Elaborado pela autora

Quando fermentado a 1mL de concentração de indutor e menores valores de umidade, o *B. amyloliquefaciens*, produziu um biossurfactante com uma tensão superficial reduzida, 48 mN/m, conforme Gráfico 31.

Gráfico 31. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada com a concentração do indutor e umidade em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a tensão



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 12 mostra que houve diferença significativa, para 36 horas de fermentação, para o índice de emulsificação, apenas para a variável temperatura, as variáveis concentração do indutor e umidade não apresentaram diferença significativa. Os experimentos 1 (66,71%), 2 (56,87%), 3 (53,04%), 4 (58,36%), 5 (56,96%), 6 (54,43%), 7 (61,04%), 9 (54,82%), 12 (60,6%), 13 (58,57%), 14 (55,98%), 15 (57,59%) e 17 (58,59%) apresentaram os melhores emulsificantes, mantendo pelo menos 50% do volume de emulsão original, conform mencionado por Pinto, Martins e Costa (2009).

Tabela 12. Índice de emulsificação do biossurfactante em 36 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Índice de Emulsificação (%)
1	1,3	36	112	66,71 Aaa
2	0,7	32	88	56,87 Aaa
3	1,3	36	88	53,04 Aaa
4	1,3	32	88	58,36 Aaa
5	0,7	32	112	56,96 Aaa
6	0,7	36	112	54,43 Aaa
7	0,7	36	88	61,04 Aaa
8	1,3	32	112	37,98 Aaa
9	1,5	34	100	54,82 Aaa
10	1	37	100	45,59 Aaba
11	1	31	100	20,27 Aba
12	0,5	34	100	60,6 Aaa
13	1	34	120	58,57 Aaa
14	1	34	80	55,98 Aaa
15	1	34	100	57,59 Aaa
16	1	34	100	49,25 Aaa
17	1	34	100	58,57 Aaa

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

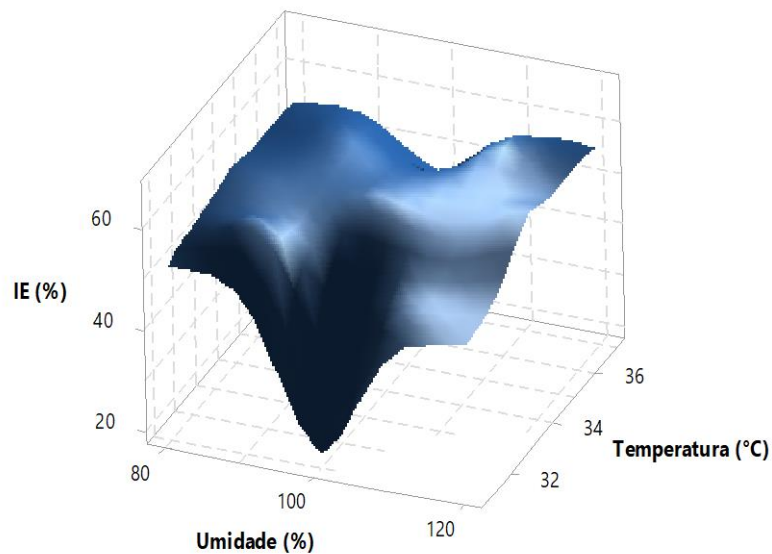
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade

Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 32 mostra que o menor índice, 20,27%, de emulsificação, para 36 horas de fermentação, foi encontrado quando combinou 31°C+100% de umidade, já o maior índice de emulsificação, 66,71, foi obtido com a combinação 36°C+112% de umidade.

Gráfico 32. Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada a temperatura e umidade em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para o índice de emulsificação

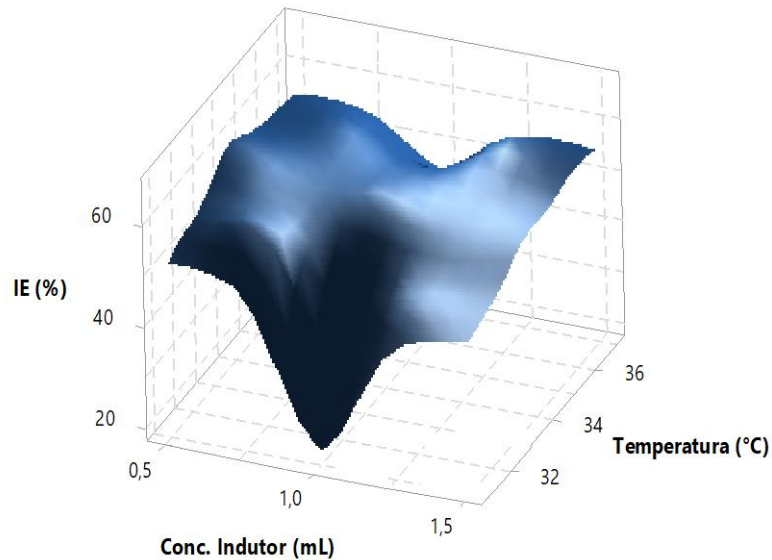


Fonte: Elaborado pela autora

Quando combinados baixa temperatura+1 mL de solução indutora, foi encontrado efeito negativo no índice de emulsificação, conforme a Gráfico 33.

Gráfico 33. Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada a temperatura e concentração do indutor em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para o índice de emulsificação

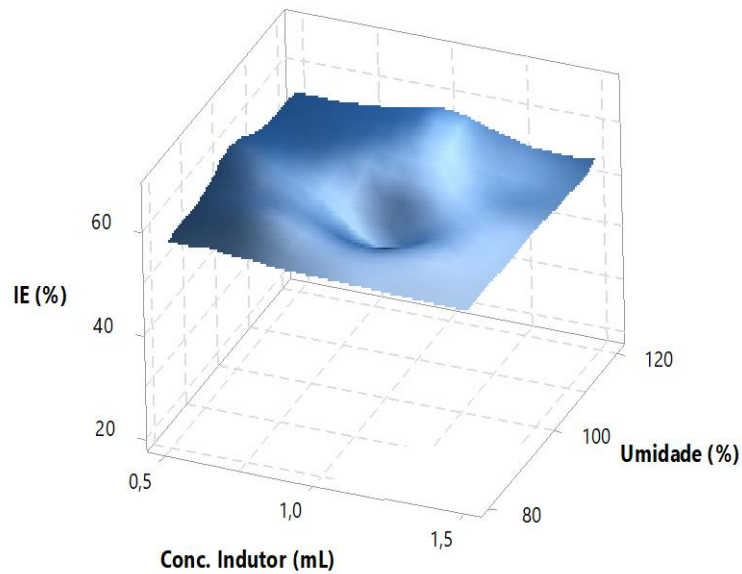


Fonte: Elaborado pela autora

A concentração 1 mL de indutor combinada com diferentes porcentagens de umidade, por 36 horas de fermentação, mais uma vez mostrou interferir na estabilidade do biossurfactante, ocasionando em uma emulsão que manteve apenas 20% do volume da emulsão original, como visto no Gráfico 34.

Gráfico 34. Superfície ajustada para o índice de emulsificação quando comparada a umidade e concentração do indutor em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para o índice de emulsificação



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 13 mostra que a produção de biossurfactante, em 36 horas de fermentação, não teve diferença significativa entre as variáveis temperatura, umidade e concentração do indutor.

Tabela 13. Produção de biossurfactante em 36 horas de fermentação.

Experimentos	Conc. Indutor (mL)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Produção (g/L)
1	1,3	36	112	2,31 Aaa
2	0,7	32	88	2,08 Aaa
3	1,3	36	88	4,47 Aaa
4	1,3	32	88	2,14 Aaa
5	0,7	32	112	2,01 Aaa
6	0,7	36	112	3,24 Aaa
7	0,7	36	88	2,32 Aaa
8	1,3	32	112	2,16 Aaa
9	1,5	34	100	2,18 Aaa
10	1	37	100	2,26 Aaa
11	1	31	100	2,3 Aaa
12	0,5	34	100	2,09 Aaa
13	1	34	120	2,185 Aaa
14	1	34	80	2,19 Aaa
15	1	34	100	2,12 Aaa
16	1	34	100	2 Aaa
17	1	34	100	2,3 Aaa

A,B...médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para concentração do indutor.

a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para temperatura .

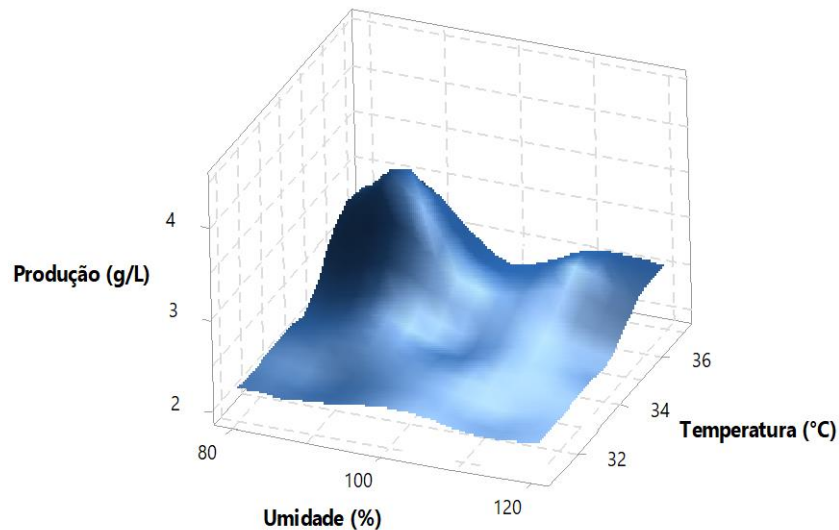
a,b...médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para umidade

Fonte: Elaborado pela autora

O maior valor de produção de biossurfactante obtido para 36 horas de fermentação, conforme visto na Gráfico 35, foi obtido com a combinação 36°C+88% de umidade, 4,47 g/L.

Gráfico 35. Superfície ajustada para a produção quando comparada a temperatura e umidade em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção

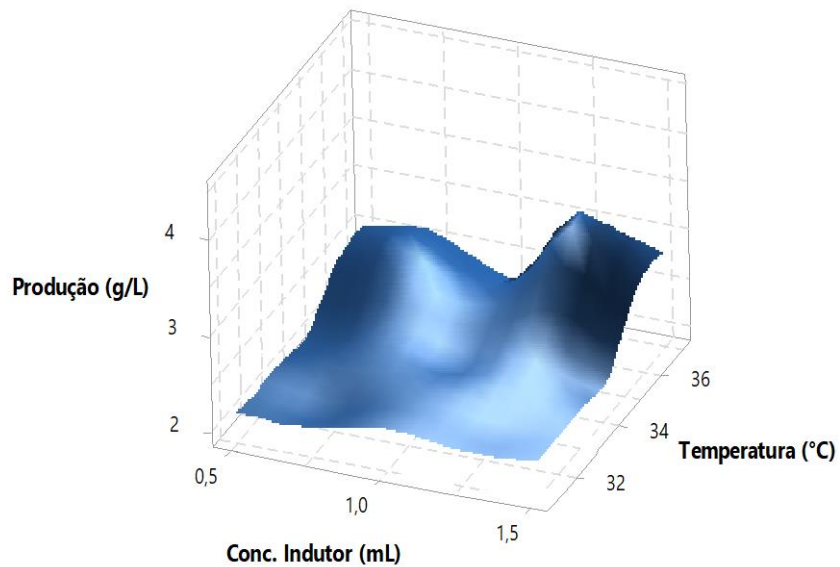


Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 36 mostra mais uma vez que a temperatura 36°C foi uma boa variável para o aumento da produção de biossurfactante, quando realizada a fermentação em 36 horas, quando combinada com 1,3 mL de concentração de indutor.

Gráfico 36. Superfície ajustada para a produção quando comparada a temperatura e concentração do indutor em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção

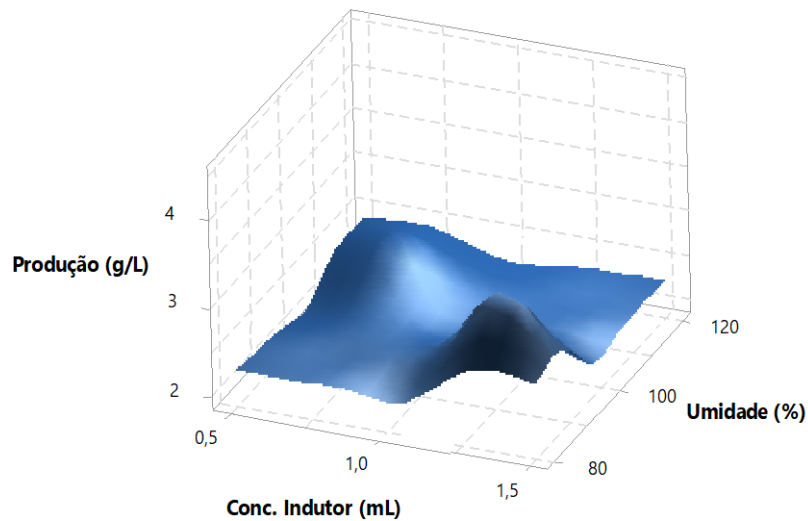


Fonte: Elaborado pela autora

A combinação de uma elevada concentração de indutor, combinada a uma baixa umidade também proporcionou um aumento na produção do biossurfactante, em 36 horas de fermentação, conforme o Gráfico 37.

Gráfico 37. Superfície ajustada para a produção quando comparada umidade e concentração do indutor em 36 horas de fermentação.

Superfície ajustada para a produção



Fonte: Elaborado pela autora

Assim, observando os tempos de fermentações 24, 30 e 36 horas foi possível obter um biossurfactante que mantivesse uma emulsão estável por pelo menos 50% do volume da emulsão original, conforme proposto neste estudo, para os tempos de fermentação 24, 30 e 36 horas. Aconselha-se trabalhar com 24 horas de fermentação, por conciliar emulsões estáveis a uma economia em tempo de processo, podendo tornar a produção de biossurfactante mais competitiva. Porém, mais estudos ainda são necessários para otimizar o processo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante ao estudo realizado em fermentação em estado sólido, com o *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizando farelo de trigo com substrato, pode-se concluir:

- O perfil de produção do biossurfactante em relação ao tempo mostrou que em 36 e 48 horas obtem-se os melhores resultados de redução na tensão superficial.
- Para os melhores valores do índice de emulsificação aconselha-se trabalhar entre 18 e 42 horas, quando são obtidos valores superiores a 60%
- Soluções de FeSO_4 , NaSO_4 e MnSO_4 adicionadas à fermentação causam efeito negativo na redução da tensão superficial.
- A solução de FeSO_4 e MnSO_4 não tiveram efeitos positivos no índice de emulsificação.
- A solução de NaSO_4 mostrou valores de índice de emulsificação acima dos valores obtidos em uma fermentação em uma fermentação padrão, porém acima de 24 horas a emulsão obtida mostrou-se equiparável à uma fermentação sem adição de solução de NaSO_4 , ainda sendo mais vantajoso não adicionar metais e conseqüentemente custos à produção.
- Para obtenção de um biossurfactante com a emulsão estável, aconselha-se trabalhar com 24 horas de fermentação, para uma economia em tempo de processo.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. G. A. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224 – 1229, 2008.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC**, 16th ed., Arlington, VA: AOAC International, 1995.

AQUINO, P. L. M. **Produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus velezensis* utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011.

BANAT, I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités, **Biofuture**, v. 198, p.44–47. 2000.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495-508, 2000.

BARROS, F. F. C. **Estudo das Variáveis de Processo e Ampliação de Escala na Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* em Manipueira**. f.102. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, 2007.

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

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

BERNHEIMER, A. W.; AVIGAD, L.S. Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, v. 61, p. 361– 369, 1970.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.152, p.41-52, 1999.

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

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 89 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2008.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná. 2009.

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

CAMILOS NETO, D. **Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido**. 2010. 158 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, 2010.

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

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, n.3, p.408-412, 1981.

COOPER D. G., PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**. 1984;47(1) p. 173-176.

COSTA, G. A. N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

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

DANIELS, L.; LINHARDT, R. J.; BRYAN, B.A.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. **European Patent App. 282, 942**, 1988.

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

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. **Biosurfactants: production, properties applications**. Ed. Marcel Decker: New York, cap 3, 1993.

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

FEDDERN, V.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Boletim da SBCTA**, v. 27, p.800-804, 2007.

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

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GREEK, B. F. Detergent Industry Ponders Product for New Decade. **Chemical Engineering News**, v. 68, p. 37-38, 1990.

HAFENBURG, D.; HOMMEL, R.; KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advanced Biochemistry Engenier**, v. 33, p. 53, 2003.

HOROWITZ, S., GILBERT, J.N., GRIFFIN, W. M. Isolation and characterization of surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal Microbiology**. Vol 6. P. 243-248. 1990.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAHARA, H.; MOTOMIYA, T.; YAMAGUSHI, M; **Japanese Patente Kokai Tokkyo Koho** 63 182,029 1988.

IQBAL, S.; KHALI, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *pseudomonas aeruginosa*. **Letters in applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.

JOHNSON,V.; SINGH, M.; SAINI, V.S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V. YADAR, N.K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorule glutinis* II P-30. **Biotechnology Letters**. v. 14, n.6 p.487-490, 1992.

JÖNSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, K.; KRONBERG, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. Wiley: New York, cap. 1, 1998.

KACHHOLZ, T., SHINGMANN, M., **Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment**. In: KOSARIC, N.; CAIRS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Ed). *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Cap. 7, p. 183-210, 1987.

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 Bioengineering**, v. 84, p. 41-46, 1997.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal Bioscience Engineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and applied chemistry**, v. 64 n.11 p. 1731 1737, 1992.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

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

LIN, S.C. Biosurfactants: recents advances. **Journal Chemistry Techonoly Biotechnology**. v.66, p.109-120, 1996.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology Bioengineer**. 1989, 33: 365-368.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.2, n.2, p.237-241, 1999.

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

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

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Structural characterization of a biosurfatant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2(3): p. 367-372, 1999.

MEIRA, J.A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**. 94f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, n.1 p.61-64, 1994.

MESQUITA, A. C. **Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro. 158 p. 2004.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MONTEIRO, S.A. **Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. 118f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MUKHERJEE, A.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p.479–489, 2005.

MULLIGAN, C.N. Environmental applicantions for biosurfactants. **Environmental Polution**, v.133, n.2, p.183-198, 2005.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. **Factors influencing the economics of biosurfactants**. In: KOSARIC, N (Ed.), *Biosurfactants, Productions, Properties, Applications*. New York: Marcel Dekker, p. 329-371, 1993

NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biosurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. 2004. 88 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Campinas. 2004.

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

NITSCHKE, M. PASTORE, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.106, p. 295-302, 2003.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: remarkable biomolecules from inexpensive substrates. **Biotechnology Progress**, v.21, p. 1593-1600, 2005.

OHATA, K.; KAMATA, K. **Japanese Patent Kokai 61-227, 827**. 1986.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin and surfactin by a dual producer, *Bacillus RB14*, in solid-state fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 517-519, 1995.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G. COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biosurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2009.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of Paraffins

Biodegradation and Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* in the Presence of Crude Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 321-324, 2003.

REISER, J.; KOCH, A.K.; JENNY, K., KAPPELI, O. Structure, properties, and production of biosurfactants. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.3: Biotechnology for aerospace applications. ORINGER, J.W.; TILLINGUEST, H.S. eds., Gulf Publishing Company, London, p. 85-97, 1989.

RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., OLIVEIRA, R. Low cost fermentative medium for biosurfactante production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, 32, p. 135-142, 2006.

ROSEN, M. J. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. John Wiley and Sons, New York, 1978.

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

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**. 40 (3). 207-17. 1995.

SHIGETA, A. YAMASHITA, A. Method of modifying quality of wheat flour product. **JP. S6 1205449**, KAO Crop. 1986.

SILVEIRA, G. G. **Resíduos agroindustriais como potenciais substratos para a produção de renina microbiana por *mucor miehei* utilizando fermentação em estado sólido**. 118f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 44-49.1997.

VELIKONJA, J.; KOSARIC, N. Biosurfactant in food application. (1993). In **Biosurfactants: production, properties applications**; Kosaric, N., Eds.; New York, Marcel Dekker. p. 419 - 446.

WATERS, J.; PORTER, M.R. **Recent Developments in the Analysis of Surfactants**. ed. Crown House., cap. 6 UK. 1991.

YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus liqueniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p. 1706- 1713, 1995.

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews Biotechnology**, v. 1, ed. 2, p. 87-107, 1984.