



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

Gisele Ferreira Bueno

Produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como
substrato

São José do Rio Preto

2014

Gisele Ferreira Bueno

Produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como
substrato

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência 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.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Angeles Manresa Presas

São José do Rio Preto

2014

Bueno, Gisele Ferreira.

Produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como substrato / Gisele Ferreira Bueno. -- São José do Rio Preto, 2014

138 f. : il., tabs.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Coorientador: Angeles Manresa Presas

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Biossurfactantes. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Resíduos industriais. 5. Águas residuais.

I. Bianchi, Vanildo Luiz Del. II. Manresa Presas, Ángeles.

III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gisele Ferreira Bueno

Produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como
substrato

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência 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

Prof. Dr. Jonas Contiero
UNESP – Rio Claro

Prof^a. Dr^a Iracema de Oliveira Moraes
Fundação André Tosello – Campinas

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz
UNESP – Rio Preto

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de março de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais José Luiz e Georgina e minha avó Maria, pelo amor, incentivo, confiança e por sempre torcer pelo meu sucesso.

A vocês meu eterno agradecimento, amor e respeito.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação e ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado regular (2011/09675-5), pelo Auxílio Pesquisa (2011/18426-9) e pela bolsa BEPE – Bolsa Estágio em Pesquisa no Exterior (2012/13457-6) concedido e aos Assessores responsáveis pela análise dos respectivos processos, pela atenção aos relatórios e comentários.

Aos funcionários Sueli, Newton, Alana e Tânia e Alex, por todo auxílio me concedido.

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi pela orientação, paciência e acima de tudo pela sua amizade e carinho ao longo desses 9 anos. Acredito que Deus nos dá presente quando coloca algumas pessoas na nossa vida, com certeza o Prof Vanildo é um deles. Não tenho como agradecer de maneira significativa tudo o que ele fez por mim durante todo esse tempo, com seus ensinamentos, amizade e exemplo, acima de tudo como ser humano maravilhoso que é. Somente quem tem a honra de trabalhar e o conhecer talvez entenderá. Meus sinceros e eterno agradecimento.

A Professora Angeles Manresa Presas e a todos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia Sanitária da Universitat de Barcelona, por me aceitar no doutorado sanduíche, e me ajudar na sua execução e proporcionar os 6 meses mais intensos da minha vida. Aprendi e amadureci muito em todos os quesitos. A todos colegas de laboratório de Barcelona, Nacho, Gui, Ari, Jonathan, em especial Jhoanne, pela amizade e carinho e ajuda na vivência em outro país. A Skaiste pela amizade e tornar minha estadia bem mais prazerosa em Barcelona.

Aos colegas de laboratório, Pedro, Samara, Ariane, Vivian, Lady, Luis Virgilio, Adilson, em especial aos estagiários de iniciação, Afonso, Ana Carolina, Vanessa, Fernando e Ederson por contribuir com a concretização deste.

A todos estrangeiros que passaram nesse período no nosso laboratório e trouxeram um pouco de cultura, conhecimento e alegria a todos nós.

E um agradecimento especial ao companheiro de doutorado e cafés no fim da tarde, Maurício Bonatto pela amizade e por contribuir com análise estatística deste projeto.

As minhas amigas companheiras de doutorado Juliana Guerra, Michele Coimbra, Adriana, Crislen, Juliana Ferreira e Marília Cattelan, por todo apoio dado durante esse período e por momentos de descontração, durante a execução deste trabalho.

As minhas amigas, Crislene, Lívia, Amanda, Bruna, Fernanda Ferraz, Karin, a turma da DNApta, Valéria, Priscila e Sérgio Aoki, e a todos do grupo do fds/dds, Octaviano, Patrícia, André e Edgar, pela amizade e por tornar esse período da minha vida bem mais agradável.

A minha amiga-irmã Fernanda Ribeiro Aoki, pela amizade, carinho, atenção, risadas, companheirismo, diversão, muita alegria e pelo apoio nos períodos difíceis. Você é a maior prova de que até mesmo coisas não tão boas que aparecem na vida são capazes de trazer coisas maravilhosas.

Aos meus pais José Luiz e Georgina e minha querida avó Maria, pelo apoio, carinho, compreensão e suporte, mais que fundamentais para que esse trabalho pudesse acontecer. Sem vocês eu não teria chegado até aqui, para vocês meu amor incondicional e eterna gratidão.

Aos meus irmãos: Henrique, Leonardo e Arthur, minha cunhada Débora e toda minha família (tios, primos) pelo carinho, apoio e presença constante.

A Deus, por colocar tantas pessoas maravilhosas em minha vida a ponto de ter de utilizar 2 folhas de agradecimento, o que me faz sentir uma pessoa muito especial, me acompanhar em todos momentos e me dar força principalmente nos momentos mais difíceis.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho se tornasse uma realidade.

MUITO obrigada a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
CMC	Concentração micelar crítica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DQO	Demanda Química de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
Fe	Ferro
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
mN/m	Milinewton metro
N	Nitrogênio
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas empresas
TRH	Tempo de retenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbico de fluxo ascendente (Upflow anaerobic sludge blanket)
TS	Tensão Superficial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do reator anaeróbio tipo UASB	43
Figura 2	Gráfico de Pareto dos efeitos para a tensão superficial do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	47
Figura 3	Superfície ajustada para a tensão quando comparada em relação ao indutor e ao substrato do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	48
Figura 4	Médias da tensão superficial em relação ao substrato e ao indutor do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	49
Figura 5	Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada em relação à umidade e ao substrato do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	50
Figura 6	Médias da tensão superficial em relação ao substrato e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	51
Figura 7	Superfície ajustada da tensão em relação ao indutor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	51
Figura 8	Médias da tensão em relação ao indutor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	52
Figura 9	Gráfico de Pareto dos efeitos em relação à variável peso do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	54
Figura 10	Superfície do peso (g/L) em relação ao substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	55
Figura 11	Médias da produção bruta de biossurfactante (g/L) em relação ao substrato e ao umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus</i>	55

Subtilis

Figura 12	Superfície da quantidade de biossurfactante em relação ao substrato e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	57
Figura 13	Médias da produção (g/L) em relação ao substrato e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	57
Figura 14	Superfície do peso em relação ao substrato e ao tempo do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	58
Figura 15	Médias do peso em relação ao substrato e ao tempo do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	59
Figura 16	Superfície do peso em relação ao umedecedor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	60
Figura 17	Médias do peso em relação ao umedecedor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	61
Figura 18	Superfície do peso em relação ao umedecedor e ao tempo do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	61
Figura 19	Média dos pesos em relação ao umedecedor e ao tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	62
Figura 20	Superfície do peso em relação à umidade e ao tempo do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	63
Figura 21	Médias da produção (g/L) em relação à umidade e ao tempo do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	63
Figura 22	Gráfico de pareto dos efeitos para o índice de emulsificação do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	66
Figura 23	Superfície ajustada do índice em relação ao substrato e ao	66

indutor do micro-organismo *Bacillus Subtilis*

Figura 24	Médias do índice em relação ao substrato e ao indutor do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	67
Figura 25	Superfície ajustada do índice em relação ao substrato e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	68
Figura 26	Médias do índice em relação ao substrato e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	69
Figura 27	Superfície do índice em relação ao indutor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	70
Figura 28	Médias do índice em relação ao indutor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	71
Figura 29	Gráfico de pareto dos efeitos para a atividade do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	73
Figura 30	Superfície da atividade em relação ao substrato e ao umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	74
Figura 31	Médias da atividade em relação ao substrato e ao umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Subtilis</i>	74
Figura 32	Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada em relação ao substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	76
Figura 33	Médias da tensão superficial de acordo com o substrato e o umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	77
Figura 34	Superfície ajustada para a tensão superficial de acordo com o substrato e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	78

Figura 35	Médias da tensão superficial em relação ao substrato e ao indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	78
Figura 36	Superfície ajustada da tensão superficial de acordo com umedecedor e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	79
Figura 37	Médias da tensão superficial em relação ao umedecedor e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	80
Figura 38	Valores de tensão superficial de acordo com o indutor e a umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	81
Figura 39	Médias da tensão superficial em relação indutor e à umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	81
Figura 40	Tensão superficial de acordo com umidade e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	82
Figura 41	Médias da tensão superficial de acordo com umidade e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	83
Figura 42	Produção bruta de acordo com substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	86
Figura 43	Média da produção bruta de acordo com substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	87
Figura 44	Produção de acordo com substrato e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	88
Figura 45	Médias de produção para a combinação substrato e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	89
Figura 46	Produção de acordo com substrato e umidade do micro-	89

organismo *Bacillus Amyloliquefaciens*

Figura 47	Médias de produção de acordo com substrato e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	90
Figura 48	Produção de acordo com substrato e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	91
Figura 49	Médias de produção de acordo com substrato e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	91
Figura 50	Produção de acordo com umedecedor e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	92
Figura 51	Médias de produção de acordo com umedecedor e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	93
Figura 52	Produção de acordo com indutor e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	94
Figura 53	Médias de produção de acordo com indutor e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	94
Figura 54	Produção de acordo com indutor e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	95
Figura 55	Médias de produção de acordo com indutor e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	96
Figura 56	Índice de emulsificação de acordo com substrato e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	98
Figura 57	Médias do índice de emulsificação de acordo com substrato e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	99
Figura 58	Índice de emulsificação de acordo com substrato e umedecedor	100

do micro-organismo *Bacillus Amyloliquefaciens*

Figura 59	Médias do índice de emulsificação de acordo com substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	101
Figura 60	Índice de emulsificação de acordo com umedecedor e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	102
Figura 61	Médias do índice de emulsificação de acordo com umedecedor e indutor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	103
Figura 62	Atividade emulsificante em relação ao substrato e indutor, sendo tampão fosfato como umedecedor, 80% de umidade e 48h de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	105
Figura 63	Atividade emulsificante em relação ao substrato e indutor, sendo manípueira como umedecedor, 80% de umidade e 48h de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	105
Figura 64	Atividade emulsificante em relação ao substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	106
Figura 65	Médias da atividade emulsificante em relação ao substrato e umedecedor do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	107
Figura 66	Atividade emulsificante de acordo com substrato e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	108
Figura 67	Atividade emulsificante em relação ao substrato e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	109
Figura 68	Atividade de acordo com substrato e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	109
Figura 69	Médias da atividade emulsificante de acordo com substrato e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus</i>	110

Amyloliquefaciens

Figura 70	Atividade emulsificante de acordo com umedecedor e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	111
Figura 71	Médias da atividade emulsificante de acordo com umedecedor e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	111
Figura 72	Atividade emulsificante de acordo com umedecedor e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	112
Figura 73	Médias da atividade emulsificante em relação ao umedecedor e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	113
Figura 74	Atividade emulsificante de acordo com indutor e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	113
Figura 75	Médias da atividade emulsificante de acordo com indutor e umidade do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	114
Figura 76	Atividade emulsificante de acordo com umidade e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	115
Figura 77	Médias da atividade emulsificante em relação à umidade e tempo de fermentação do micro-organismo <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	115
Figura 78	Eficiência dos reatores tipo UASB com DQO 2000 mg.L ⁻¹ e 2% de biossurfactante	119
Figura 79	Eficiência dos reatores tipo UASB com DQO 2000 mg.L ⁻¹ e 5% de biossurfactante	119
Figura 80	Eficiência dos reatores tipo UASB com DQO 2000 mg.L ⁻¹ e 8% de biossurfactante	120

Figura 81	Eficiência dos reatores UASB com DQO de 2000 mg.L ⁻¹ e 2% de biossurfactante	124
Figura 82	Eficiência dos reatores UASB com DQO de 2000 mg.L ⁻¹ e 5% de biossurfactante	124
Figura 83	Eficiência dos reatores UASB com DQO de 2000 mg.L ⁻¹ e 8% de biossurfactante	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos	24
Tabela 2	Planejamento fatorial empregado no estudo	45
Tabela 3	Resultados da ANOVA fatorial para a tensão	46
Tabela 4	Resultados da ANOVA fatorial para a produção de biossurfactante	53
Tabela 5	Resultados da ANOVA fatorial para o índice de emulsificação	65
Tabela 6	Resultados da ANOVA fatorial para a atividade emulsificante	72
Tabela 7	Resultados da ANOVA fatorial para a tensão superficial	75
Tabela 8	Resultados da ANOVA fatorial para a produção bruta de biossurfactante	85
Tabela 9	Resultados da ANOVA fatorial para o índice de emulsificação	97
Tabela 10	Resultados da ANOVA fatorial para a atividade emulsificante	104
Tabela 11	Condições ótimas de processo para cada variável dependente	116
Tabela 12	Análise dos reatores UASB com DQO de aproximadamente 2000 mg.L ⁻¹ e 2% de biossurfactante	117
Tabela 13	Análise dos reatores UASB com DQO de aproximadamente 2000 mg.L ⁻¹ e 5% de biossurfactante	118

Tabela 14	Análise dos reatores UASB com DQO de aproximadamente 2000 mg.L ⁻¹ e 8% de biossurfactante	118
Tabela 15	Média das alcalinidades de entrada e saída dos reatores UASB	121
Figura 16	Média da turbidez de entrada e saída dos reatores UASB	121
Figura 17	Análise dos reatores UASB (reator e controle) com DQO de aproximadamente 2000 mg.L ⁻¹ e 2% de biossurfactante	122
Figura 18	Análise dos reatores UASB (reator e controle) com DQO de aproximadamente 2000 mg.L ⁻¹ e 5% de biossurfactante	123
Figura 19	Análise dos reatores UASB (reator e controle) com DQO de aproximadamente 2000 mg.L ⁻¹ e 8% de biossurfactante	123
Figura 20	Média das alcalinidades de entrada e saída dos reatores UASB com água residuária de frigorífico	126

SUMÁRIO

RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Biossurfactante	23
2.2 Classificação e natureza química dos biossurfactantes	23
2.3 Produção de biossurfactante	24
2.3.1 <i>Biossurfactantes produzidos por Bacillus</i>	25
2.3.2 <i>Alternativa para produção de biossurfactante: fermentação em estado sólido</i>	26
2.3.3 <i>Produção de Biossurfactante por substratos alternativos</i>	28
2.4 Aplicações Industriais	31
2.4.1 <i>Tratamento de Águas residuárias</i>	31
2.4.2 <i>Tratamento biológico anaeróbio</i>	32
2.4.3 <i>Tratamento biológico anaeróbio com adição de biossurfactantes</i>	33
2.4.4 <i>Águas residuárias de indústria de Laticínios</i>	34
2.4.5 <i>Águas residuárias de indústria de Frigoríficos</i>	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivos gerais	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Micro-organismo	39
4.1.1 <i>Manutenção da Cepa</i>	39
4.2. Meios utilizados para produção do biossurfactante	39
4.2.1 <i>Substratos sólidos</i>	39
4.2.1.1 <i>Farelo de trigo</i>	39
4.2.1.2 <i>Crueira</i>	39
4.2.1.3 <i>Bagaço de cana</i>	40
4.2.2 Solução indutora	40
4.2.2.1 <i>Glicerol</i>	40
4.2.2.2 <i>Óleo de fritura</i>	40

4.2.3 Solução umedecedora	40
4.2.3.1 Solução tampão-fosfato	40
4.2.3.2 Manipueira	40
4.3. Condições de produção do biossurfactante	40
4.3.1 Extração do Biossurfactante	41
4.3.2 Quantificação do biossurfactante (Produção bruta)	41
4.4 Determinação da umidade dos substratos sólidos	41
4.5 Determinação da Tensão Superficial	42
4.6 Determinação do Índice de Emulsificação	42
4.7 Determinação da Atividade Emulsificante	42
4.8 Utilização do biossurfactante no tratamento de efluentes industriais	42
4.8.1. Reator	43
4.8.2. Lodo (Inóculo)	43
4.8.3. Água Residuária	44
4.9 Análises físico-químicas_	44
4.9.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)	44
4.9.2 pH	44
4.9.3. Acidez e Alcalinidade	44
4.9.4. Turbidez	44
5. Análise Estatística	44
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1. <i>Bacillus subtilis</i>	46
6.1.1 Tensão Superficial	46
6.1.2 Produção de biossurfactante (peso)	53
6.1.3 Índice de emulsificação	64
6.1.4 Atividade emulsificante	71
6.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	75
6.2.1 Tensão Superficial	75
6.2.2 Produção de biossurfactante (peso)	84
6.2.3 Índice de emulsificação	97
6.2.4 Atividade Emulsificante	103
6.2.5 Análise Geral	116
6.3. Aplicação de biossurfactante em reatores UASB	117

6.3.1 Água Residuária da Indústria de Laticínios	117
6.3.1.1 DQO	119
6.3.1.2 pH	120
6.3.1.3 Alcalinidade e Acidez	120
6.3.1.4 Turbidez	121
6.3.2 Água Residuária de Frigorífico	122
6.3.2.1.DQO	124
6.3.2.2 pH	125
6.3.2.3 Alcalinidade e Acidez	125
6.3.2.4 Turbidez	126
7 CONCLUSÕES	127
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

RESUMO

Os biossurfactantes são produzidos por micro-organismos e são compostos com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade com capacidade de reduzir as tensões superficial e interfacial. Devido à vantagem de serem mais biodegradáveis quando comparados com os surfactantes de origem química, eles são mais apropriados para serem empregados em diversas aplicações. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* através de substratos distintos em fermentação em estado sólido e utilizar o biossurfactante produzido no tratamento biológico de efluentes industriais que contenham óleos e gorduras. Foram realizadas as fermentações com *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando os substratos sólidos: farelo de trigo, crueira e bagaço de cana. As fermentações ocorreram em sacos de polietileno com 10 gramas de substrato sólido, acrescidos de solução tampão fosfato, manipueira e água destilada (como solução umedecedora na concentração para se obter 40, 60 e 80% de umidade) e 1 mL de glicerol ou óleo de fritura (como solução indutora) ou água destilada e foram incubados a 37 °C por 48, 72 e 96 horas. Foram efetuadas análises de tensão superficial, índice de emulsificação, atividade emulsificante e produção bruta do biossurfactante (peso). Os resultados encontrados indicam que o micro-organismo *Bacillus amyloliquefaciens* produz biossurfactante e é capaz de reduzir a tensão superficial com valores próximos e até melhores do que o micro-organismo *Bacillus subtilis*. Com relação a sua utilização em sistemas de tratamento de águas residuárias, não foram verificados resultados satisfatórios, porém não devem ser descartados estudos posteriores para melhores adequações das metodologias empregadas.

Palavras-chave: Biossurfactante. Fermentação em estado sólido. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

*Biosurfactants are produced from microorganisms and are compounds with low toxicity and high biodegradability with ability to reduce surface and interfacial tensions. Due to the advantage of being more biodegradable compared to the chemical origin ones, they are more suitable to be used in different applications. This study aimed to evaluate the biosurfactant production by *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* through distinct substrates in solid state fermentation and use the biosurfactant produced in the biological treatment of industrial wastewater containing oil and grease. Fermentations were performed by *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* using wheat bran, crueira and sugar cane bagasse as solid substrates. Fermentations took place in plastic bags with 10 grams of solid substrate plus phosphate buffer, manipueira and distilled water (as humidifier solution in order to obtain 40, 60 and 80% humidity) and 1 mL of glycerol or an oil frying (as inductor solution) or distilled water and incubated at 37 °C for 48, 72 and 96 hours. Analysis of surface tension, emulsification index, emulsifying activity and crude biosurfactant production (weight) were performed. The results indicate that the microorganism *Bacillus amyloliquefaciens* produces biosurfactant and is capable of reducing the surface tension to near and even better values than the microorganism *Bacillus subtilis*. With respect to their use in wastewater treatment systems, no satisfactory results were observed, but no further studies should be discarded for better adaptations to the employed methodologies.*

Keywords: *Biosurfactant. Solid state fermentation. Agroindustrial residues.*

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes constituem um grupo importante de compostos químicos sintetizados por micro-organismos e podem ser amplamente utilizados em diversos setores industriais.

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Porém, o crescimento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, gerou um interesse por surfactantes biológicos como alternativa aos produtos existentes. A aplicação de biossurfactantes em indústrias ainda é limitada pelo custo elevado em comparação com os surfactantes produzidos quimicamente, relacionados com a matéria-prima, baixa quantidade de produto gerado e a dificuldade de recuperação.

O sucesso da produção de biossurfactante depende do desenvolvimento de processos que reduzam custos de matérias-primas, já que estas são responsáveis por cerca de 30% de todo o custo de produção e também das condições e/ou fatores que influenciam o crescimento microbiano.

O gênero *Bacillus* é um gênero importante sob o ponto de vista biotecnológico devido à produção de lipopeptídeos de caráter anfifílico, que apresentam atividade surfactante e antimicrobiana. Por conta desta propriedade, este gênero, e, em especial, *Bacillus subtilis*, tem sido largamente estudado.

Culturas de *Bacillus subtilis* são capazes de produzir um lipopeptídeo cíclico conhecido como surfactina. Algumas cepas de *B. subtilis* também podem produzir, além da surfactina, outros lipopeptídeos cíclicos denominados iturina A e fengicina, como co-produtos durante a fermentação. A surfactina é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m.

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* e sua estrutura geral é composta de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros.

O conhecimento das propriedades químicas dos biossurfactantes é de grande importância, pois, através deste, pode-se ter uma maior percepção das necessidades para a produção e desta forma pode melhorar o processo fermentativo, já que a estrutura química e as propriedades físicas dos

biossurfatantes podem ser obtidas e/ou modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

A produção de biossurfactante pode ocorrer basicamente através das fermentações em estado sólido (FES) e submersa (FS). Mas na fermentação submersa ocorre o problema da formação de espuma devido à aeração e agitação forçada durante a produção, o que acarreta perda de rendimento e produtividade. Já a fermentação em estado sólido é uma tecnologia simples, para produção de compostos de interesse, sendo uma alternativa de se evitar a formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por fermentação submersa.

Neste trabalho, a fermentação em estado sólido foi estudada devido a diversas vantagens, como a já citada e, além disso, a FES tem como vantagem um menor investimento inicial, baixo consumo de energia e a possibilidade de empregar resíduos agroindustriais como matérias-primas. A grande vantagem é que a utilização desses resíduos permite diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento.

Tendo-se em vista a busca de novas fontes renováveis, as quais estejam facilmente disponíveis, que sejam viáveis para a produção de biossurfactantes e que possibilitem a redução de custos, bem como o aumento da produtividade, este projeto teve como objetivo produzir biossurfactante em fermentação estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato e avaliar a utilização de biossurfactantes no tratamento de efluentes agroindustriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossurfactantes

Surfactantes, tanto de origem biológica como química, são caracterizados pela formação de estrutura de agregados, como micelas, com concentração micelar crítica (CMC), possuindo potencial para diminuir as tensões superficiais e capacidade para formar emulsões, para solubilizar óleos para produção de detergentes e formação de espuma (COSTA et al., 2010).

São moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que, através de seu acúmulo nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), reduzem as tensões superficial e interfacial aumentando a área superficial de compostos insolúveis, permitindo o aumento da biodisponibilidade, mobilidade e subsequente biodegradação (PIRÔLLO, 2006).

São compostos com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000), com possibilidade de produção *in situ* e a partir de fontes renováveis. Apresentam as mesmas propriedades dos surfactantes químicos, sendo sua aceitabilidade ecológica a vantagem mais importante sobre os originados quimicamente (HABA et al., 2000).

2.2 Classificação e natureza química dos biossurfactantes

Uma das principais classes de surfactantes naturais é composta por biossurfactantes. Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química e origem microbiana. As principais classes abrangem os: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993). As principais classes de biossurfactantes juntamente com os micro-organismos envolvidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos

Tipo de Biossurfactante	Micro-organismo
Glicolipídios - ramnolipídios - soforolipídios - trehalolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas - Peptídio-lipídio - Viscosina - Serrawetina - Surfactina - Subtilisina - Gramicidina - Polimixina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios - Ácidos graxos - Lipídios neutros - Fosfolipídios	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos - emulsan - biodispersan - liposan - carboidrato-lipídio-proteína - manana-lipídio-proteína	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados - vesículas - células	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: (DESAI; BANAT,1997)

Eles têm uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbonada de um ou mais ácidos graxos que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxila, fosfato, carboxilato ou carboidrato (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; BOGNOLO, 1999).

2.3 Produção de biossurfactante

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

existentes. A aplicação de biossurfactantes em indústrias é limitada pelo custo elevado em comparação com os surfactantes produzidos quimicamente, relacionados com a matéria-prima, baixa quantidade de produto gerado e recuperação complicada (UYSAL; TURKMAN, 2005).

Os biossurfactantes apresentam vantagens com relação aos de origem química, tais como: podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas; possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, que os tornam comparáveis ou superiores aos sintéticos em termos de eficiência, e não dependem da variação de preço dos derivados de petróleo como os surfactantes de origem química (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A produção de biossurfactantes pelos micro-organismos está intimamente ligada às condições ambientais e nutricionais fornecidas e os fatores que influenciam o crescimento microbiano afetam também a sua produção (DESAI; BANAT, 1997; MUKHERJEE; DAS, 2005). Temperatura, pH, agitação e oxigênio afetam a produção de biossurfactantes pelo seu efeito sobre o crescimento e atividades celulares (DESAI; BANAT, 1997). Fontes de carbono (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999), nitrogênio (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002) e micronutrientes como ferro (WEI; LAI; CHANG, 2007) e manganês (COOPER et al., 1981) são fatores que afetam a produção desses compostos.

2.3.1 Biossurfactantes produzidos por *Bacillus*

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* produzem diversos lipopeptídeos que demonstram grande propriedade tensoativa (ROSENBERG; RON, 1999).

Os lipopeptídeos tensoativos são formados estruturalmente de diversos aminoácidos ligados covalentemente com o grupo carboxila e hidroxila de ácidos graxos β -hidróxi. As estruturas podem variar na composição de aminoácidos, posição do anel lactona e na porção lipídica (YAKIMOV et al., 1995).

Essa classe de biossurfactante é talvez a mais conhecida por suas atividades antibióticas, sendo melhor caracterizada aquela produzida por *Bacillus sp*, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina (BARROS et al., 2007).

Muitos biossurfactantes lipopeptídeos, além de atividades antibióticas, possuem também diversas funções biológicas, como, por exemplo, bactericida,

fungicida, antiviral, agente antitumoral, inibidor da formação de coágulos, dentre outras (BARROS, 2007).

A surfactina é o principal biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*, sendo conhecida pela capacidade excepcional de atividade superficial e de redução da tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m (BARROS et al., 2007).

A ação da surfactina parece estar relacionada a alterações na integridade das membranas, devido à capacidade do lipopeptídeo em interagir com os fosfolipídeos presentes nas membranas celulares (MAGET-DANA; PTAK, 1995).

O tipo, as propriedades e a quantidade de biossurfactantes produzidos pelos micro-organismos, como, por exemplo, produzido pelo *Bacillus subtilis*, dependem não somente do micro-organismo utilizado, mas também do substrato disponível, pois a modificação do substrato freqüentemente altera a estrutura do produto e, conseqüentemente, suas propriedades (REISER et al., 1989).

O conhecimento das propriedades químicas dos biossurfactantes é de grande importância, pois, através destas, pode-se ter uma maior percepção das necessidades para a produção e conseqüentemente poder melhorar o processo fermentativo, já que a estrutura química e as propriedades físicas dos biossurfactantes podem ser obtidas e/ou modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (REISER et al., 1989).

2.3.2 Alternativa para produção de biossurfactante: fermentação em estado sólido

A produção de biossurfactante pode ocorrer basicamente através da fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS). Na fermentação submersa, ocorre um problema sério quando utilizada para produzir tensoativos, devido ao fato de que esse tipo de produção precisa de agitação e aeração forçada. Quando o biossurfactante começa a ser produzido, ocorre a geração de grandes quantidades de espuma, e há uma tendência das células do micro-organismo produtor, nutrientes e produto acumular-se nela, sendo necessária, então, a utilização de métodos de contenção de sua formação (CAMILOS NETO, 2010), o que pode gerar um custo adicional à produção.

A fermentação em estado sólido surge como uma tecnologia simples para a produção de biossurfactantes, sendo uma alternativa para evitar o problema da formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por fermentação submersa (CAMILOS NETO, 2010).

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está em um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001).

Essa disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos, que não seriam produzidos na fermentação submersa, além de possibilitar, em alguns casos, uma maior produtividade volumétrica e um maior rendimento em relação à fermentação submersa. Além disso, outras vantagens associadas à FES são a possibilidade de obtenção de extratos mais concentrados, o que pode facilitar o processo de purificação do metabólito de interesse (CAMILOS NETO, 2010) e a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos de fermentação, diminuindo os custos do processo (MEIRA, 2007). Dentre as aplicações que utilizam resíduos sólidos agroindustriais, destacam-se aqueles que apresentam um baixo custo e são potencialmente poluidores (MEIRA, 2007).

Muito pouco até o presente momento foi estudado com relação à produção de biossurfactantes em fermentação em estado sólido (FES), principalmente utilizando bactérias do gênero *Bacillus*. Atualmente, a maioria das pesquisas sobre produção de biossurfactante em estado sólido envolve a produção a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (MEIRA, 2007; MONTEIRO, 2007; CAMILOS NETO, 2010) e fungos (CERQUEIRA, 2007; CASTIGLIONI, 2006).

A produção do biossurfactante surfactina por *Bacillus subtilis* RB14 em fermentação em estado sólido foi estudada por Ohno, Ano, Shoda (1995). Estes pesquisadores utilizaram como substrato o resíduo sólido da produção do extrato de soja (*okara*), e obtiveram surfactina em uma concentração de 2,0 g/kg. Veenanadig; Gowthaman; Karanth (2000) estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus*

subtilis FE-2 em biorreator de FES utilizando farelo de trigo como substrato e obtiveram uma redução de tensão superficial de 54 mN/m para 24 mN/m.

Das; Mukherjee (2007) estudaram a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* 34 (DM-03 e DM-04) por FES utilizando casca de batata como substrato e obtiveram uma redução de TS de 72 mN/m para 40 mN/m com a cepa *B. subtilis* DM-03 e de 72 mN/m para 33 mN/m com a cepa *B. subtilis* DM-04.

A produção de lipopeptídeos por *B. pumilus* em FES foi estudada por Bugay (2009). Okara e uma mistura de okara e espuma de polipropileno foram utilizados como substratos sólidos neste trabalho; o nível de produção para ambos foi em torno de 0,4 g/kg de sólido seco (BUGAY, 2009).

Sendo assim, a fermentação em estado sólido é de interesse para a produção de biossurfactante por bactérias do gênero *Bacillus*, sobretudo por duas razões: a FES possibilita a utilização de resíduos sólidos como substratos de baixo custo, podendo dessa forma reduzir o custo e viabilizar a produção desse importante tensoativo; o uso da FES evita a formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por FS, pois junto com a espuma há a saída, e conseqüentemente a perda de nutrientes, produtos e biomassa, o que reduz a produtividade, ou em casos extremos inviabiliza a fermentação (LEE; KIM, 2004).

2.3.3 Produção de biossurfactante a partir de substratos alternativos

O custo de produção é um dos principais fatores no desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico. Atualmente, a maioria dos compostos tensoativos é de origem sintética. O principal fator que restringe o uso generalizado de biossurfactantes é o seu custo de produção quando em comparação com o de origem sintética (COSTA et al., 2010).

A produção de biossurfactantes em larga escala depende, portanto, do desenvolvimento de processos de baixo custo, especialmente no que se refere às matérias-primas, uma vez que estas representam até 30% do custo total de produção (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

A busca pela redução do custo de produção de biossurfactantes e, ao mesmo tempo, pela redução dos problemas ambientais relacionados ao descarte e custos do tratamento de resíduos, tem motivado estudos voltados para a produção desses compostos a partir de fontes renováveis de nutrientes (NITSCHKE. 2004).

O Brasil possui características climáticas e territoriais excelentes e uma biodiversidade única no mundo, com grande abundância de biomassa e resíduos agroindustriais líquidos e sólidos, matérias-primas que constituem os processos biotecnológicos (LEAL et al., 2002).

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

Uma das principais dificuldades na seleção desses substratos alternativos é encontrar a composição adequada que permita tanto o crescimento celular como o acúmulo do produto de interesse. Em geral, subprodutos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos ou lipídeos suprem as necessidades para uso como fonte de carbono na produção de biossurfactantes (MERCADE; MANRESA, 1994).

Os substratos caracteristicamente utilizados na FES são de origem agroindustrial, subprodutos ou produtos agrícolas propriamente ditos processados ou não. Como exemplos, têm-se grãos de arroz, raízes de mandioca, soja, farelo de arroz, farelo de trigo, fubá, casca de arroz e de trigo, que podem ser utilizados como substratos (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002), juntamente com a cana de açúcar.

Embora esses substratos geralmente sejam constituídos de altos teores de proteínas, lipídios e micronutrientes, ainda são pouco utilizados para o consumo humano devido às características sensoriais. Além disso, seus valores nutricionais são questionáveis, especialmente pela disponibilidade de nutrientes e as condições sanitárias decorrentes do manejo inadequado, que gera produto de baixo valor comercial. Uma alternativa para agregar valor a esses subprodutos é a sua utilização no processo biotecnológico, sendo utilizados como substrato na produção de biomassa microbiana, além de outros metabólitos do processo fermentativo (LEAL et al., 2002).

Considerando que uma grande quantidade de resíduos podem servir como substratos para a produção de vários compostos de interesse industrial, a produção de biossurfactante por FES apresenta duas justificativas muito fortes: por um lado, a utilização de resíduos sólidos abundantes no Brasil, o que pode reduzir o custo de produção e colaborar para solucionar problemas ambientais relacionados com esses resíduos, além da possibilidade de agregar valor a esses subprodutos do setor

agroindustrial e, por outro, a FES evita a formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por fermentação submersa. Entretanto, para viabilizar a utilização de resíduos sólidos por FES e conseqüentemente a produção de biossurfactante, faz-se necessário o desenvolvimento e implementação de tecnologias de biorreatores de FES para produção em larga escala (MEIRA, 2007).

O farelo de trigo é o substrato mais pesquisado e utilizado para a FES 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.

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).

Já o bagaço de cana é um subproduto com maior quantidade de celulose, proveniente do processamento da cana de açúcar nas destilarias e usinas açucareiras. O produto é constituído de aproximadamente 50% de celulose, 25 % de hemicelulose e 25% de lignina. Quimicamente, contém aproximadamente 50% de celulose, 30% de pentosanas e 2,4% de cinzas e, devido a essa pequena quantidade de cinzas, o bagaço de cana oferece inúmeras vantagens em comparação a outros resíduos agroindustriais como palhas de arroz e trigo que têm 17,5 e 11% de conteúdo de cinzas, respectivamente (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Os resíduos da industrialização da mandioca podem ser convertidos em subprodutos de valor econômico agregado, destinar-se às rações para a pecuária em geral, ricas em amido e fibras e também podem ser empregados no processo de FES (STRAPASSON, 2003). Alguns dos resíduos da mandioca são: a casca marrom, entrecasca, crueira (grossos), fibras, bagaço e varredura e entre os resíduos líquidos, a manipueira.

Durante os processos de industrialização da mandioca, parte do material a ser peneirado fica retido na malha, caracterizando um farinhão denominado crueira. Este material é bastante fibroso e constituído por partes da raiz e entrecasca e geralmente será separado na peneira, antes da etapa de secagem (NEVES, 2004). Segundo o mesmo autor, observa-se que este material tem despertado pouco interesse em sua caracterização comparado a outros resíduos da indústria da mandioca, pois os dados disponíveis na literatura referem-se geralmente a

caracterizações em resíduos líquidos, como da manipueira ou em resíduos sólidos como nos farelos, bagaço, etc.

Outras fontes alternativas para a produção de biossurfactantes são os óleos vegetais utilizados em frituras. No Brasil, há grande produção e consumo de óleos vegetais, principalmente óleo de soja, gerando elevados volumes de resíduos. De acordo com a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) 1 litro de óleo pode chegar a contaminar 1 milhão de litros de água. Uma solução para o tratamento dos resíduos de óleos vegetais seria a sua biotransformação.

Um dos principais subprodutos obtidos da produção do biodiesel é o glicerol. Com a grande demanda de biodiesel devido à implantação da Lei Federal 11.097/2005, um dos problemas a ser resolvido é o destino do glicerol gerado. Assim, o uso do glicerol proveniente de plantas de biodiesel poderá ser mais uma alternativa a ser estudada (COSTA et al., 2010).

2.4 Aplicações Industriais

Atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais, tais como: petroquímico, cosméticos, farmacêutico, mineração, metalúrgico, agroquímico, celulose, papel, fertilizantes, bebidas e alimentos, ambiental, entre outros (KOSARIC, 1992; BANAT, 2000; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MULLIGAN, 2005).

2.4.1 Tratamento de Águas Residuárias

No Brasil, os setores de indústrias de carne e laticínios são responsáveis por uma boa parte da economia do país. Os efluentes das indústrias de alimentos são caracterizados por altas concentrações de óleos e graxas, sulfatos, nitratos e fosfatos e, conseqüentemente, apresentam elevada demanda química de oxigênio (DQO), apresentando baixa biodegradabilidade (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Alguns métodos convencionais para tratamento de efluentes incluem a reutilização de certas frações de soro de queijo em indústrias de laticínios e de sangue em matadouros. Quando isso não é possível, vários processos são usados, dentre eles principalmente os processos aeróbios. Entretanto nas duas últimas décadas o uso de processos anaeróbios vem aumentando (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

2.4.2 Tratamento biológico anaeróbio

A degradação de cadeias moleculares mais complexas presentes nos efluentes líquidos pode ocorrer com a presença de oxigênio dissolvido, que é utilizado no metabolismo dos micro-organismos nos processos aeróbios. Quando não há oxigênio dissolvido na fase livre, alguns micro-organismos utilizam sais inorgânicos como aceptores de elétrons.

A remoção da matéria orgânica do efluente doméstico ocorre através do processo de catabolismo. Conforme Von Sperling (1996), os dois grupos de catabolismo de interesse no tratamento de esgoto são: o catabolismo oxidativo e o catabolismo fermentativo. Os reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) utilizam estes dois processos em seu funcionamento.

A idéia fundamental da concepção do UASB é fornecer condições para que grande quantidade de lodo biológico fique retida em seu interior, sem a necessidade de um meio suporte inerte. Isso é alcançado pelo separador trifásico, associado a diversos parâmetros operacionais do sistema, como baixas velocidades de escoamento, bem como a formação e manutenção de grânulos com boas características de sedimentabilidade. Dos reatores anaeróbios existentes, 67% são reatores anaeróbios de manta de lodo (UASB – crescimento suspenso), 12% são tanques de agitação continua, filtros anaeróbios 7%, outros 14% (BARBER; STUCKEY, 1999).

O tratamento anaeróbio vem sendo muito utilizado por agroindústrias e indústrias de alimentos porque traz algumas vantagens: não precisa de equipamento para aeração, e apresenta um baixo excesso de lodo, em relação ao processo aeróbio (VIDAL et al., 2000). Esse tipo de processo apresenta algumas vantagens, além das já citadas, como, por exemplo, baixo consumo de energia, baixos custos de implantação, produção de CH_4 , aplicabilidade em pequena e grande escala, tolerância a elevadas cargas orgânicas e baixo consumo de nutrientes (MENDES et al., 2006; ROSA, 2004).

No tratamento biológico anaeróbio de efluentes com excesso de óleos e graxas, a degradação de lipídeos é uma etapa limitante, pois os lipídeos possuem pouca biodegradabilidade, devido a sua baixa disponibilidade. A hidrólise de triacilgliceróis libera ácidos graxos de cadeia longa e glicerol; quando esses ácidos graxos estão em excesso, ocorre a adsorção deles na superfície do lodo,

dificultando o transporte de substratos solúveis para os micro-organismos (OMIL et al., 2003; MASSE et al., 2001).

2.4.3. Tratamento biológico anaeróbio

A preocupação com a qualidade, preservação e tratamento de águas tem sido um dos principais assuntos discutidos mundialmente. A adição de surfactantes em sistemas de tratamento de efluentes industriais tem sido considerada como uma estratégia promissora para o tratamento biológico de resíduos principalmente nos que contém óleos e graxas. Por exemplo, foi constatado que o sistema de lodo ativado convencional pode remover a maior parte de óleos e graxas na concentração inicial inferior a 600 mg/L, mas em concentrações mais elevadas, a adição de surfactante foi necessária para facilitar a biodegradação (LIU; NAKHLA; BASSI, 2004).

Estudos do tratamento de efluentes oleosos em reatores anaeróbios são quase inexistentes, pois a ênfase tem sido dada para o tratamento de efluentes com pequena concentração de lipídios e resíduos de hidrocarbonetos. Pouco também é relatado do uso de compostos biológicos ou mesmo da inserção de outros micro-organismos, com características conhecidas e desejadas no sistema anaeróbio. Porém, mas foram encontrados relatos de uso de enzimas para auxiliar o processo de tratamento do efluente e o estudo sobre a biodisponibilidade de nutrientes para reatores anaeróbios. O uso de surfactantes sintéticos é descrito para auxiliar o processo de disposição final do lodo ativado e o de biosurfactantes mostra-se bastante restrito em tratamento de efluentes industriais, sendo mais explorado na recuperação de ambientes poluídos com resíduos de hidrocarbonetos (SOBREIRA, 2004).

A biodegradação de efluentes e compostos ricos em hidrocarbonetos é dependente de sua estrutura, de modo que, quanto mais solúveis, maior será sua degradabilidade. Os surfactantes são substâncias que têm a capacidade de formar micelas, reduzindo a tensão superficial, impedindo a formação de pontes de hidrogênio e certas interações hidrofílicas e hidrofóbicas, que permitem se ligarem às substâncias de polaridades diferentes, como água e óleo. Além dos surfactantes, as lípases apresentam grandes possibilidades de aplicação nas indústrias, pois estão ligadas à deterioração de alguns produtos, principalmente de laticínios e de óleos comestíveis (CASTIGLIONI, 2006).

A adição de surfactante em reatores de lodos ativados é viável na redução de concentrações elevadas de óleo e graxa através do aumento da sua biodisponibilidade (ZHANG et al., 1998).

Óleos e graxas de resíduos de óleo geralmente são aglutinados, o que dificulta a passagem pelos dutos de drenagem e caixas de gordura de modo que eles não são facilmente removidos e também são resistentes ao tratamento biológico de diversos micro-organismos (LI; WRENN, 2004).

O tratamento biológico tem sido considerado como um método eficiente para lidar com os efluentes que contenham lipídeos, bem como outros tratamentos, incluindo ar dissolvido, floculação, flotação e filtração por membranas (CHANG; CHUNG; HAN, 2001).

A adição de surfactante foi eficaz na digestão anaeróbia de águas residuárias com elevadas concentrações de óleos e graxas (NAKHLA et al., 2003). Porém, sendo de baixa biodegradabilidade, o surfactante de origem química se acumula nos sistemas de tratamento de efluentes industriais e, além disso, inibe a biodegradação de outros hidratos de carbono através da formação de espuma e isolando o ar dos micro-organismos presentes no lodo. Assim, biossurfactantes são mais desejáveis para aplicação nas indústrias, devido às suas capacidades específicas de biodegradabilidade e toxicidade baixa (ZHANG et al., 1998).

A utilização da tecnologia híbrida através da utilização de biossurfactantes associado com tratamento biológico anaeróbio pode permitir a redução do tempo de retenção hidráulica e, conseqüentemente, do volume do reator, uma vez que promove a biodisponibilidade das gorduras, que causam problemas de entupimento do leito de lodo em reatores anaeróbios do tipo UASB (CHERNICHAO, 1997).

2.4.4 Águas residuárias de indústria de Laticínios

A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria alimentícia. O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, ocupando o sexto lugar, segundo dados da FAO, com volume aproximado de 25,3 bilhões de kg/ano e possui aproximadamente 2 mil indústrias de laticínios sob inspeção federal. Essas indústrias estão localizadas na sua maioria na região Sudeste, onde se situa a maior bacia leiteira do país (SEBRAE, 2014).

Apesar dos laticínios representarem um importante setor na indústria alimentícia do ponto de vista econômico, os laticínios também se inserem em uma

problemática ambiental, considerando que um grande número de empresas ainda lança seus efluentes sem nenhum tipo de tratamento nos cursos d'água, a contribuição dessas indústrias em termos de poluição hídrica é bastante significativa. O problema agrava-se se for considerado que 90% dos laticínios em funcionamento são de pequeno e médio portes. Um levantamento feito com pequenos e médios laticínios no estado de Minas Gerais revelou que 90% dos efluentes gerados nesses estabelecimentos não recebem tratamento adequado (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Os efluentes líquidos das indústrias de laticínios têm origem na lavagem e/ou enxaguamento de latões de leite, tanques, tubulações de leite, mangueiras de soro, bombas, equipamentos, utensílios utilizados diretamente na produção, pisos e paredes. Além dos detergentes e desinfetantes, os compostos associados ao leite, como gorduras, proteínas e carboidratos contribuem para a composição do efluente, sendo que 1 kg de gordura equivale a 3 kg de DQO, 1 kg de lactose equivale a 1,13 kg de DQO e 1 kg de proteína equivale 1,36 kg de DQO .

Gavala et al. (1999) relataram que efluentes de laticínios podem apresentar DQO em torno de 3000 mg/L no processamento do leite e um valor de 50.000 mg/L quando são fabricados outros produtos derivados do leite, quando há grande produção de queijos e derivados, por exemplo. Entretanto, as características dos efluentes líquidos variam dependendo do tipo do processo adotado (MENDES et al., 2006).

Nesses tipos de efluentes, o teor de lipídeos é superior a 1.500 mg/L. Os lipídeos causam flotação da biomassa e má formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios de fluxo ascendente, toxicidade a micro-organismos acetogênicos e metanogênicos e formação de espumas devido ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados (GAVALA et al., 1999). Desta forma, a digestão anaeróbia destes rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante a liberação de ácidos graxos pelos micro-organismos específicos com atividade lipolítica (PERLE et al., 1995). A utilização de biossurfactante pode promover uma maior velocidade de reação de hidrólise sequencial dos grupos acila dos lipídeos, reduzindo o tempo de biodegradação destes compostos.

2.4.5 Águas residuárias de indústria de Frigoríficos

As agroindústrias destacam-se como grandes poluidoras, devido, especialmente, às elevadas vazões com que geram seus resíduos ricos em carga orgânica, nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), sólidos e óleos e graxas. Neste setor enquadram-se os matadouros e frigoríficos caracterizados pelo seu elevado potencial poluidor (MESS, 2006). O rebanho bovino brasileiro é um dos maiores do mundo – em torno de 198,5 milhões de cabeças, em 2006 (CNPQ, 2006).

Como conseqüências das operações de abate para obtenção de carne e derivados originam-se vários subprodutos e/ou resíduos que devem sofrer processamentos específicos: couros, sangue, ossos, gorduras, aparas de carne, tripas, animais ou suas partes condenadas pela inspeção sanitária, etc.

Processamentos e destinações adequadas devem ser dadas a todos os subprodutos e resíduos do abate, em atendimento às leis e normas vigentes, sanitárias e ambientais (PACHECO, 2006).

Em frigoríficos, assim como em vários tipos de indústria, o alto consumo de água acarreta grandes volumes de efluentes - 80 a 95% da água consumida é descarregada como efluente líquido (UNEP; DEPA, 2000). Estes efluentes caracterizam-se principalmente por:

- Alta carga orgânica;
- Alto conteúdo de gordura;
- Flutuações de pH em função do uso de agentes de limpeza ácidos e básicos;
- Altos conteúdos de nitrogênio, fósforo e sal;
- Teores significativos de sais diversos de cura e, eventualmente, de compostos;
- aromáticos diversos (no caso de processos de defumação de produtos de carne);

Segundo VILAS BOAS et. al. (2001), nos efluentes de matadouros e frigoríficos, o efluente é composto por grande quantidade de sangue, fragmentos de tecidos, gorduras que são liberados durante o processo de abate.

Desta forma, possuem altos valores de DBO₅ (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio), sólidos em suspensão, graxas e material flutuável. Os efluentes de graxarias, se existirem na unidade industrial, também apresentam altos valores de DBO₅ e DQO (PACHECO, 2006). O sangue tem a DQO mais alta de todos os efluentes líquidos gerados no processamento de

carnes. Sangue líquido bruto tem uma DQO em torno de 400g/L, uma DBO₅ de aproximadamente 200 g/L e concentração de nitrogênio em torno de 30g/L. Em média tem-se por cabeça de gado em torno de 1 a 5 kg de DBO₅, 0,25 a 1 kg de nitrogênio e 0,03 a 0,1 Kg de fósforo total (PACHECO, 2006).

Na fabricação de derivados de carne, estão incluídas diversas operações que geram despejos contendo sangue, tecidos, gorduras e outras substâncias. Além disto, as operações de limpeza e sanitização agregam substâncias derivadas dos detergentes e sanitizantes aos efluentes líquidos. Uma estimativa de carga orgânica em águas residuárias de uma indústria de processamento de carnes, incluindo corte e desossa da matéria-prima, é de 5,2 a 6,7kg DBO₅ /t peso vivo (PACHECO, 2006).

Pode-se citar também algumas fontes secundárias de efluentes líquidos, com volumes pequenos e mais esporádicos em relação aos efluentes industriais principais (PACHECO, 2006)

- Água de lavagem das caldeiras, descartada periodicamente (contendo sais, fuligem e eventuais substâncias orgânicas);
- Águas de resfriamento, de circuitos abertos ou eventuais de circuitos fechados (contendo sais, biocidas e outros compostos);
- Águas de lavagens de outras áreas, além das produtivas – oficinas de manutenção e salas de compressores (que podem conter óleos e graxas lubrificantes, solventes, metais etc.), almoxarifados e áreas de armazenamento (que podem conter produtos químicos diversos, de vazamentos ou derramamentos acidentais);
- Esgotos sanitários ou domésticos, provenientes das áreas administrativas, vestiários, ambulatório e restaurantes.

Segundo Pacheco (2006), padrões de higiene das autoridades sanitárias em áreas críticas das graxarias resultam no uso de quantidade significativa de água. Os principais usos de água nos frigoríficos são para:

- Limpeza de pisos, paredes e de equipamentos;
- Eventuais sistemas de resfriamento de compressores e condensadores;
- Geração de vapor;
- Lavagem dos caminhões/veículos de matérias primas;
- Transporte de subprodutos e resíduos.

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

1. Efetuar a produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido, avaliando condições de melhoria do processo utilizando diferentes resíduos sólidos agroindustriais como substrato;
2. Tratar águas residuárias da indústria de laticínios e frigorífico em reatores anaeróbios alternativos, e avaliar a utilização do biossurfactantes no processo.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a produção de biossurfactante a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando farelo de trigo, bagaço de cana e crueira como substratos;
- Avaliar os parâmetros para a produção de biossurfactante em fermentação em estado sólido;
- Determinar a tensão superficial, índice de emulsificação, produção bruta e atividade emulsificante do biossurfactante produzido;
- Analisar que parâmetros influenciam nas variáveis realizadas através do planejamento experimental;
- Avaliar a eficiência do tratamento anaeróbio em reatores tipo UASB em termos de redução de DQO do sistema;
- Comparar a eficiência do sistema com e sem a adição de biossurfactante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

As cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* utilizadas foram cedidas 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 das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* 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 agar, adicionado de meio mineral (40%, v/v) e estocado com temperatura a 4 °C.

As bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* foram inoculadas por estrias em esgotamento em tubos inclinados de ágar nutriente e incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, foi realizada uma suspensão bacteriana de cada tubo utilizando água destilada 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).

4.2. Meios utilizados para produção do biossurfactante

4.2.1 Substratos sólidos

4.2.1.1 Farelo de trigo

O farelo de trigo utilizado foi da empresa NATUS – Serviço Natus Centro de Alimentos Naturais em São José do Rio Preto – SP.

4.2.1.2 Crueira

A crueira utilizada foi proveniente da empresa “Plaza Indústria e Comércio Ltda”, Fábrica de farinha de mandioca localizada em Santa Maria da Serra, São Paulo, sendo coletada durante o período de produção da fábrica e transportada em sacos para o laboratório da UNESP de São José do Rio Preto, que foram guardados em freezer.

4.2.1.3 Bagaço de cana

O Bagaço de cana utilizado foi proveniente da Dom Tapparo Engenho, localizada em Mirassol – SP.

4.2.2 Solução indutora

4.2.2.1 Glicerol

O glicerol PA utilizado é da marca Synth.

4.2.2.2 Óleo de fritura

O óleo de fritura utilizado foi coletado de residências de São José do Rio Preto-SP.

4.2.3 Solução umedecedora

4.2.3.1 Solução tampão-fosfato

A solução tampão-fosfato utilizada nos experimentos foi preparada no laboratório de bioprocessos e, continha, por litro: 3,0g KH_2PO_4 ; 7,0g K_2HPO_4 .

4.2.3.2 Manipueira

A manipueira utilizada foi proveniente da empresa “Plaza Indústria e Comércio Ltda”, localizada em Santa Maria da Serra – SP, sendo coletada no sistema de decantação de manipueira da empresa, durante o período de produção da fábrica e transportada em galões para o laboratório da UNESP de São José do Rio Preto, que foram deixados em repouso para sedimentação do amido, o qual foi retirado. O sobrenadante foi armazenado - 18° C.

4.3 Condições de produção do biossurfactante

Os ensaios para fermentação em estado sólido foram realizados em sacos de polietileno contendo 10 g do substrato sólido, farelo de trigo, crueira e bagaço de cana.

Os substratos foram esterilizados por 15 min a 121°C, inoculados com 2 mL de suspensão celular em condições estéreis, juntamente com solução umedecedora tampão-fosfato (contendo, por litro: 3,0g KH_2PO_4 ; 7,0g K_2HPO_4), manipueira ou água

destilada, acrescida de 1 mL de fonte de carbono (glicerol e óleo de fritura ou água destilada), até atingir os teores de umidade de 40, 60, 80%, e incubados a 37° C por 48, 72 ou 96 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

O critério utilizado para a escolha do substrato e do umedecedor foi a característica de ambos serem uma boa fonte de nutrientes para o desenvolvimento do micro-organismo. O indutor serve como fonte de carbono para o desenvolvimento do micro-organismo.

4.3.1 Extração do biossurfactante

Para o isolamento do biossurfactante produzido em FES, os cultivos foram interrompidos quando completou o tempo de incubação estipulado no planejamento experimental (48, 72 ou 96 horas) 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 min a 4°C (DAS; MUKHERJEE, 2007). Para determinação tanto da produção de biossurfactante e da biomassa na fermentação em estado sólido como da tensão superficial e concentração micelar crítica foram utilizados os sobrenadantes livres de células (extratos).

4.3.2 Quantificação e Purificação 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, onde as massas foram previamente conhecidas e, em seguida, secas em estufa a 105°C até peso constante. O biossurfactante bruto produzido foi expresso em g/L.

4.4 Determinação da umidade dos substratos sólidos

O teor de umidade das amostras fermentadas foi determinado segundo metodologia da AOAC (1995), baseada na perda de peso após a secagem em estufa a 105 °C (nesse caso, por cerca de 3 a 5 h).

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 foram: volume médio da amostra de 10 mL.

4.6 Determinação do Índice de Emulsificação (IE)

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 (rotação máxima) por 2 min. Os tubos foram deixados em repouso e as medidas foram realizadas após 24, 48, 72 e 96 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 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada através da adição do tolueno ao extrato da FES livre de células (2 mL de cada), em tubos de ensaio seguidos por agitação em alta velocidade em vórtex durante 2 minutos, realizando posteriormente a leitura óptica em espectrofotômetro a 610 nm (JOHNSON et al., 1992).

4.8 Utilização do biossurfactante no tratamento de efluentes industriais

O biossurfactante utilizado nestes experimentos foi aquele que obteve o melhor resultado (em termos de redução de tensão superficial, peso (produção) e economia de tempo), encontrado nos experimentos por FES pelo micro-organismo *Bacillus subtilis*, o que ocorreu com a variável utilizando farelo de trigo, manipueira como solução umedecedora e óleo de fritura como solução indutora, com umidade de 60% em 48 horas de fermentação. O valor da tensão superficial obtido nesta variável foi em média de 32,5 mN/m. Esta variável foi utilizada nos testes realizados com adição do biossurfactante produzido em concentrações de 2, 5 e 8% no tratamento de águas residuárias de laticínio, e frigorífico pelo sistema de tratamento anaeróbio UASB. As águas residuárias tiveram o pH ajustado para 7 antes de entrar no reator.

O controle foi realizado com o tratamento anaeróbio UASB convencional. Foi utilizado reator com capacidade de 2 litros e tempo de retenção hidráulica de 3 dias.

Foram retiradas amostras antes e no final do tempo de retenção hidráulica que serviram para verificar a influência do biossurfactante através da determinação da demanda química de oxigênio (DQO) das águas residuárias quando comparada com um sistema biológico controle. Foram realizadas as análises de DQO e pH, acidez, alcalinidade e turbidez.

4.8.1. Reator

Foram confeccionados reatores, utilizando tubos de PVC de 100mm, para a confecção do reator anaeróbio tipo UASB (Figura 1).

Os reatores possuíam capacidade total de 2 litros (1 litro de volume de trabalho) e um tempo de residência (TRH) de 3 dias e mantido à temperatura ambiente.

Os reatores foram preenchidos inicialmente com 30% de seu volume utilizando lodo proveniente da Estação de Tratamento de Esgotos de São José do Rio Preto-SP.

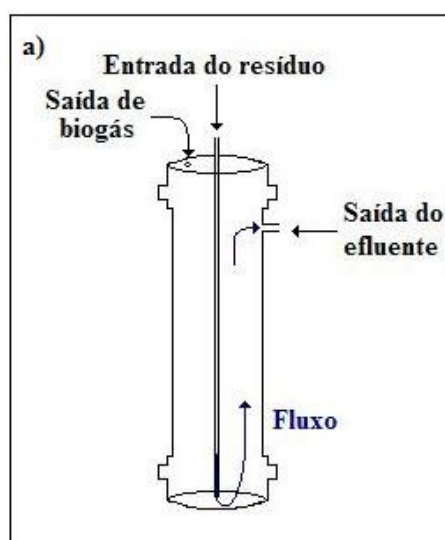


Figura 1. Esquema do reator anaeróbio tipo UASB

4.8.2. Lodo (Inóculo)

Foi utilizado como inóculo lodo de granulo fino oriundo do tratamento anaeróbio da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) São José do Rio Preto-SP.

4.8.3. Água Residuária

A água residuária de laticínio foi obtida da indústria de laticínio Tirolez, localizada na cidade de Monte Aprazível - SP.

Já a água residuária de frigorífico foi obtida do frigorífico Frig West localizado em São José do Rio Preto - SP.

As amostras foram armazenadas em galões de 5 litros a -18°C , sendo descongeladas no dia anterior à sua utilização, possibilitando a análise da DQO para que fosse realizada a diluição adequada, controlando a entrada de matéria orgânica nos reatores.

4.9 Análises físico-químicas

4.9.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para realização das análises de DQO foi utilizado o método colorimétrico de refluxo fechado, utilizando um digestor e um espectrofotômetro (Hach Co.), segundo metodologia da APHA (1995).

4.9.2 pH

O pH foi determinado utilizando um pHmetro PM 608 da marca Analion Indústria e Comércio Ltda, seguindo a metodologia descrita em APHA (1995).

4.9.3. Acidez e Alcalinidade

As análises de acidez e alcalinidade nas águas residuárias foram realizadas na entrada e saída dos reatores através do método titulométrico (SILVA, 1977),

4.9.4. Turbidez

Para a determinação da turbidez foi utilizado um turbidímetro portátil (QUIMIS), sendo fornecidos os valores em NTU, analisando a turbidez da entrada e saída da água de laticínio de cada reator.

5. Análise Estatística

A análise dos dados foi baseada em um planejamento fatorial 2^5 com três níveis para cada fator como exposto na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento fatorial empregado no estudo.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Substrato	Bagaço de cana	Crueira	Farelo de trigo
Umedecedor	Água	Tampão fosfato	Manipueira
Indutor	Água	Glicerol	Óleo de fritura
Umidade	40%	60%	80%
Tempo	48h	72h	96h

O critério utilizado para a escolha do substrato e do umedecedor foi a característica de ambos de ser boa fonte de nutrientes para o desenvolvimento do micro-organismo, sendo o farelo de trigo e a manipueira as melhores fontes de nutrientes dentre os substratos e os umedecedores, respectivamente. O indutor serve como fonte de carbono para o desenvolvimento do micro-organismo, sendo o óleo de fritura o que apresenta maior fonte de carbono, quando comparado ao glicerol e à água.

Os dados de tensão, índice, atividade e peso (variáveis dependentes) foram coletados com base no planejamento fatorial descrito acima e avaliados de acordo com os níveis dos fatores (variáveis independentes) por meio da utilização de superfícies de resposta (RSM). Os dados foram coletados em duplicata e todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 0,05.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram separados por micro-organismo para cada análise (variável) realizada.

6.1. *Bacillus subtilis*

6.1.1 Tensão Superficial

De acordo com a literatura, micro-organismos para serem considerados bons produtores de biossurfactantes 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).

A Tabela 3 mostra os resultados da ANOVA fatorial para o comportamento linear e quadrático das variáveis independentes com relação a tensão superficial encontradas nas fermentações.

Tabela 3. Resultados da ANOVA fatorial para a tensão.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L)	576,20	<0,001
Substrato (Q)	0,63	0,428
Umedecedor (L)	0,05	0,813
Umedecedor (Q)	0,40	0,526
Indutor (L)	66,13	<0,001
Indutor (Q)	16,48	<0,001
Umidade (L)	5,37	0,021
Umidade (Q)	0,40	0,526
Tempo (L)	2,11	0,148
Tempo (Q)	0,63	0,428
Substrato (L+Q)	288,41	<0,001
Umedecedor (L+Q)	0,22	0,795
Indutor (L+Q)	41,30	<0,001
Umidade (L+Q)	2,88	0,058
Tempo (L+Q)	1,37	0,256

Os resultados da Tabela ANOVA mostram influência linear significativa do substrato, indutor e umidade na tensão e influência quadrática significativa do indutor.

Dos 27 experimentos estudados usando farelo de trigo como substrato, 22 apresentaram valores menores de 40 mN/m, sendo que a variável trigo + manipuera + óleo de cozinha + 60% de umidade em 48 horas de fermentação obteve uma média de 32,5 mN/m e trigo + manipuera + óleo de cozinha + 80% de umidade em 72 horas obteve uma média de 33 mN/m.

Estes resultados podem ser considerados satisfatórios, uma vez que os extratos aquosos da FES estavam diluídos, pois, além da solução umedecedora, 100 mL de água destilada foram utilizados para extração do biossurfactante dos sólidos fermentados.

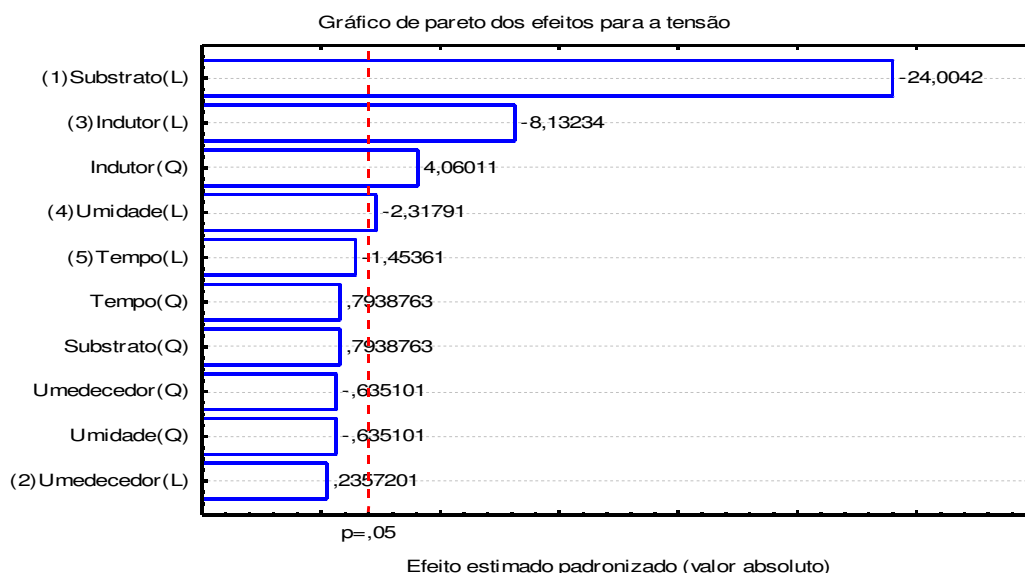


Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos para a tensão superficial.

A Figura 2 mostra o efeito relevante do substrato (L) e do indutor (L) em relação ao efeito do indutor (Q) e da umidade (L), apesar de todos apresentarem-se como significativos. Nesse caso, é interessante avaliar o comportamento da tensão superficial em relação a esses três fatores.

Outros 5 experimentos utilizando o farelo de trigo como substrato obtiveram valores de tensão superficial de 33 ou 34 mN/m, e em todas elas tinha um fator em comum: o óleo de cozinha como indutor (fonte de carbono), demonstrando este ser um dos principais fatores que podem contribuir para uma maior redução da tensão superficial obtida dentre as variáveis utilizando o farelo de trigo como substrato.

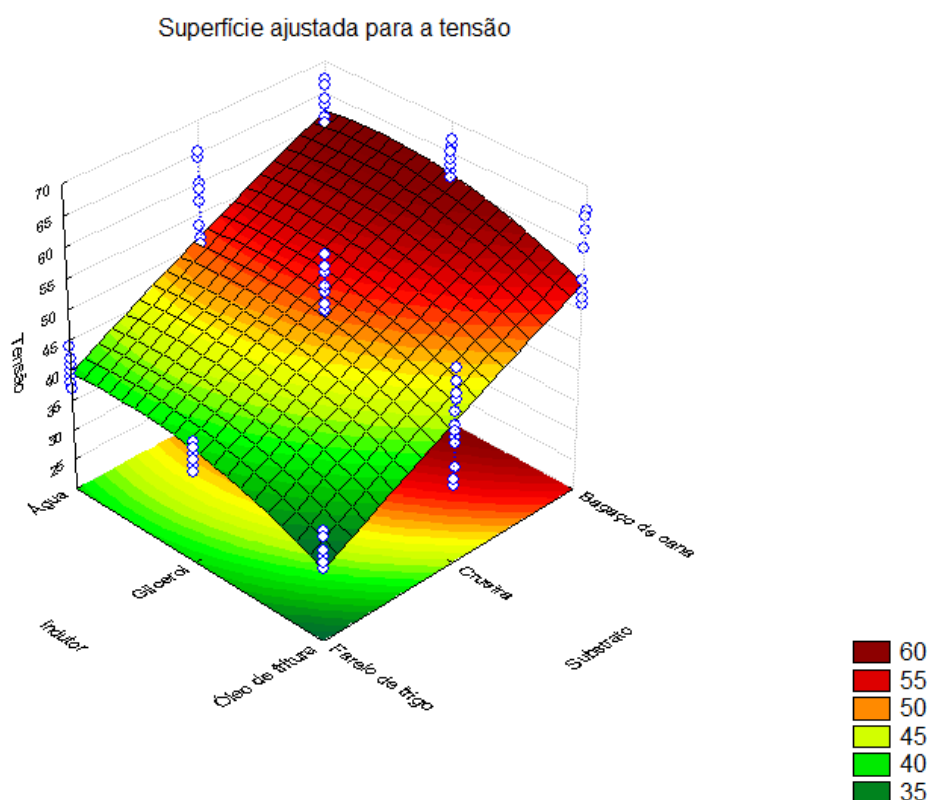


Figura 3. Superfície ajustada para a tensão quando comparada em relação ao indutor e ao substrato.

A superfície (Figura 3) mostra que a tensão superficial é menor quando a fermentação é realizada com farelo de trigo como substrato juntamente com óleo de fritura como indutor, considerando água como umedecedor, 80% de umidade e 48h de fermentação. Esses parâmetros (fatores) foram os que demonstraram o melhor resultado para a análise da menor tensão superficial. Nesse caso, a tensão é inversamente relacionada ao teor de nutrientes do substrato e ao teor de carbono do indutor, ou seja, quanto maior o teor de nutrientes do substrato e maior a fonte de carbono do indutor, será produzida uma menor tensão superficial.

É possível observar (Figura 4) que os menores valores de tensão são verificados quando a fermentação é realizada utilizando o farelo de trigo como substrato (fonte de nutrientes) e o óleo de fritura como indutor (fonte de carbono).

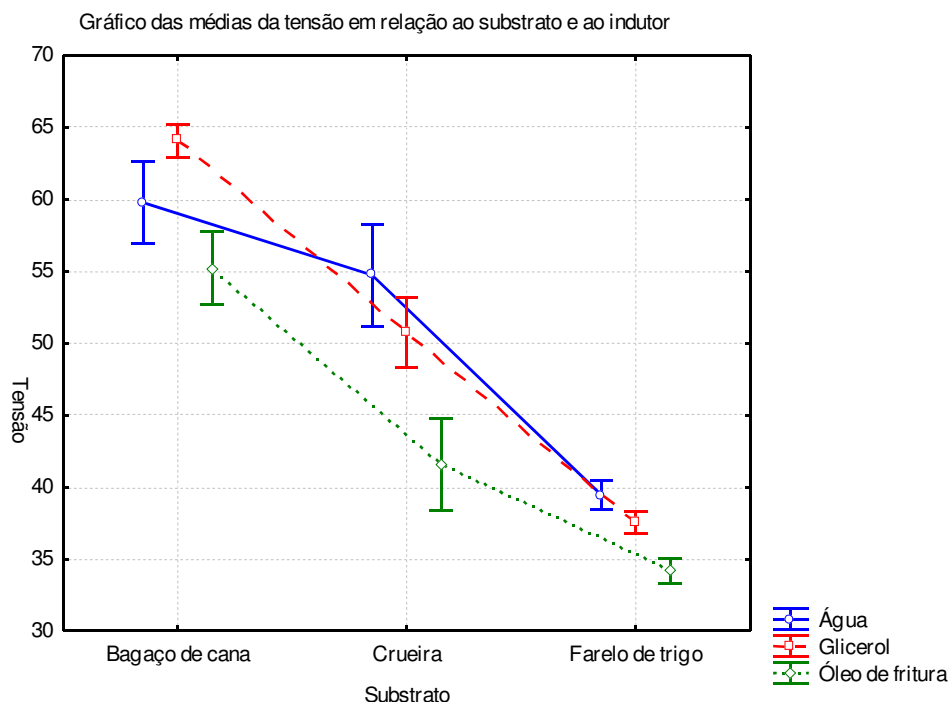


Figura 4. Médias da tensão superficial em relação ao substrato e ao indutor.

Os resultados encontrados neste trabalho são melhores do que os encontrados por Das; Mukherjee (2007) que, estudando a produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* ((DM 03 e DM 04) por fermentação em estado sólido e utilizando como substrato a casca de batata, obtiveram, após 96 horas de fermentação, a redução da tensão superficial para 40 mN/m das duas cepas, sendo que, neste trabalho, foram obtidos valores menores que esse e o tempo de fermentação foi de 48 ou no máximo em 72 horas .

Para o substrato crureira o melhor valor de tensão superficial encontrado foi de 33 mN/m, sendo o mesmo que encontrado quando utilizado o farelo de trigo, porém este valor só foi encontrado em um experimento (crureira + água + óleo de fritura + 80% de umidade com 48 horas de fermentação), dentre os 27 experimentos estudados com este substrato.

Já com relação ao substrato bagaço de cana, os melhores resultados de tensão superficial ficaram entre 51 e 52 mN/m, sendo encontrados estes valores nas variáveis que utilizou bagaço + manipueira + óleo de fritura nas 3 umidades (40, 60 e 80%) e também quando utilizado bagaço + água + óleo de fritura + 80% de umidade com 96 horas de fermentação.

A Figura 5 mostra o comportamento da tensão superficial em relação ao substrato e à umidade. É possível pressupor que as menores tensões superficiais se concentram nos tratamentos que utilizaram farelo de trigo e umidades entre 60 e 80% quando os parâmetros fixados foram: água como umedecedor, óleo de fritura como indutor e 48 horas de tempo de fermentação.

Segundo Pokorny et al. (1994) o nível de umidade na fermentação em estado sólido tem um grande impacto sobre as propriedades físicas do substrato sólido. Altos índices de umidade podem causar decréscimo da porosidade e também diminuem a transferência de oxigênio. Por outro lado, a baixa umidade diminui a solubilidade do substrato sólido, o grau de inchamento das partículas e produz uma alta tensão superficial.

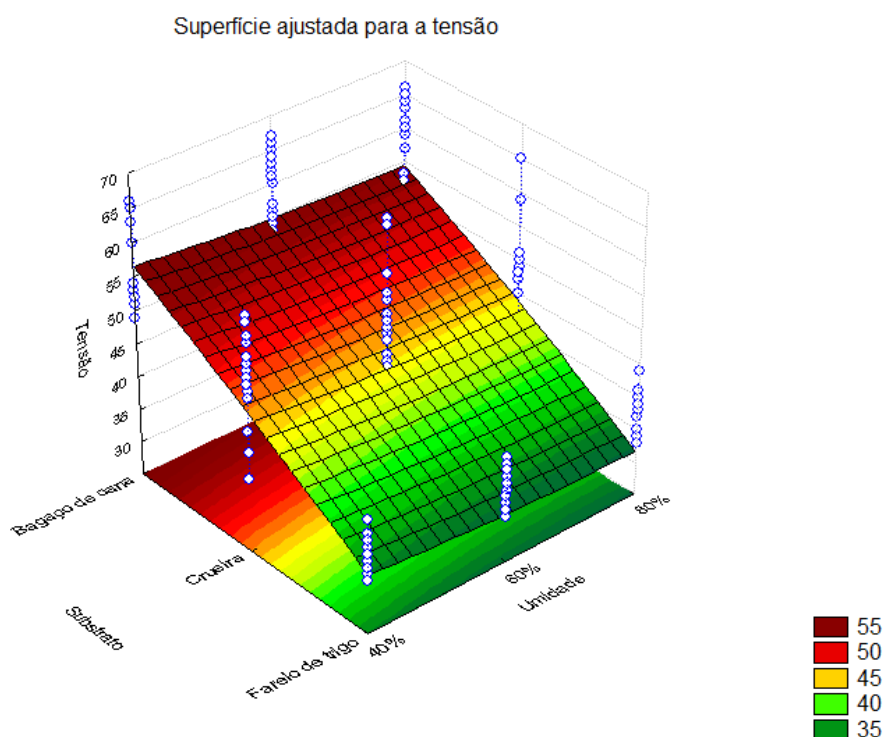


Figura 5. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada em relação à umidade e ao substrato.

A Figura 6 mostra as médias da tensão em relação ao substrato e à umidade e os resultados desse gráfico reiteram o mencionado anteriormente, ou seja, a tensão superficial assume valores menores quando o substrato do meio de

fermentação é o farelo de trigo (maior teor de nutrientes) e quando é utilizada umidade entre a faixa de 60% e 80%.

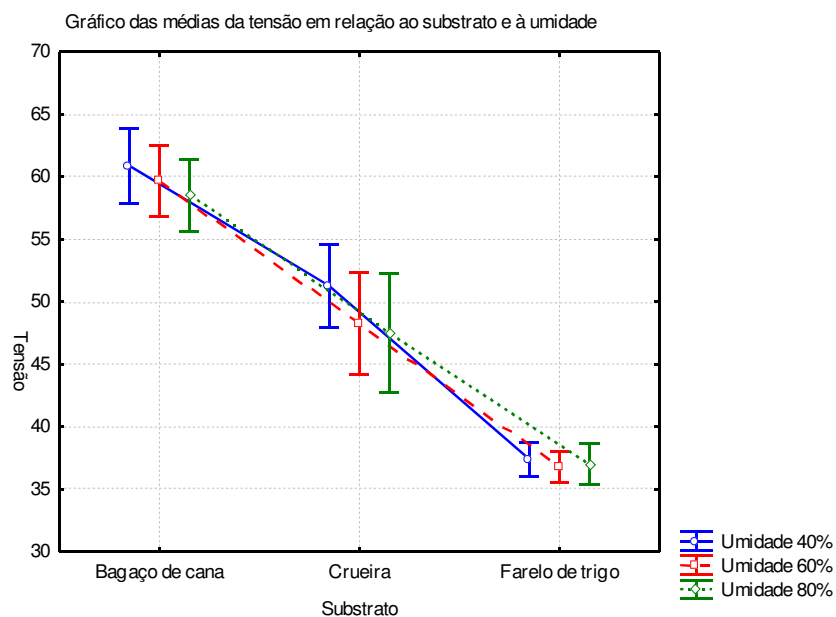


Figura 6. Médias da tensão superficial em relação ao substrato e à umidade.

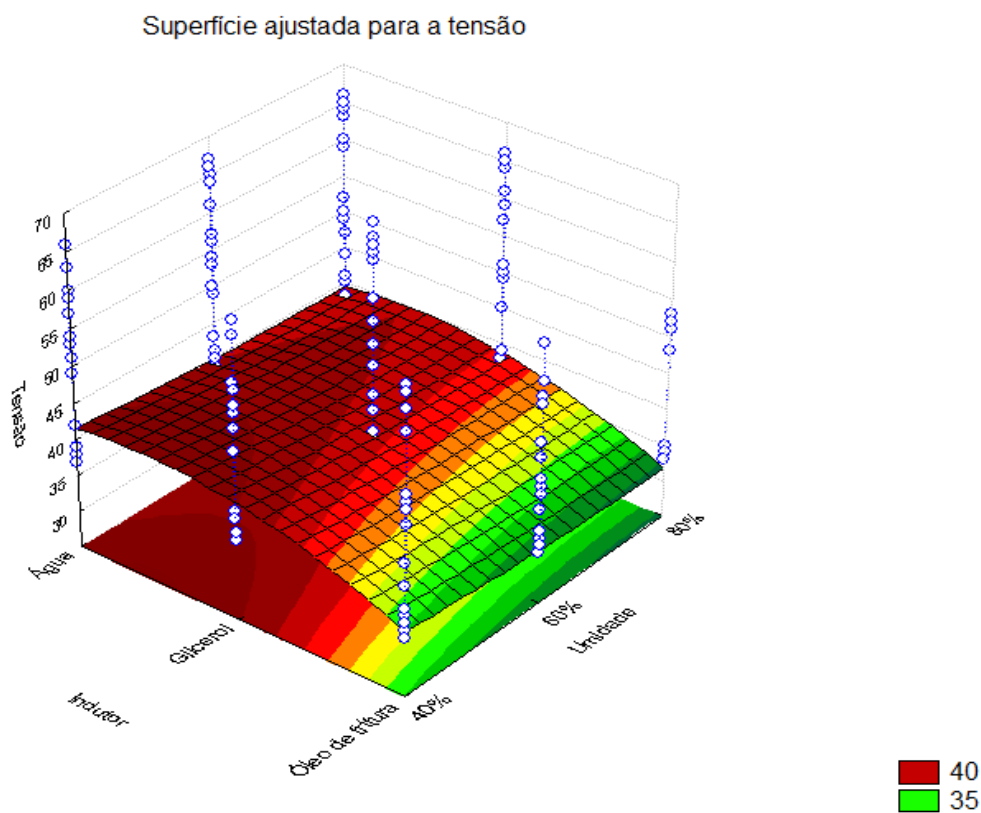


Figura 7. Superfície ajustada dos valores de tensão em relação ao indutor e à umidade.

As menores tensões superficiais estão vinculadas ao teor de umidade mais próximo de 80% e quando o óleo de fritura (maior fonte de carbono) é utilizado como indutor. Além disso, esse resultado está vinculado ao fato de utilizar farelo de trigo como substrato, água como umedecedor e 48 horas de fermentação (Figura 7).

A Figura 8 mostra o comportamento das médias da tensão quando esses parâmetros acima foram fixados, alterando o indutor e a umidade. Os menores valores médios de tensão superficial estão vinculados ao uso de óleo de fritura como indutor e umidade de 80%.

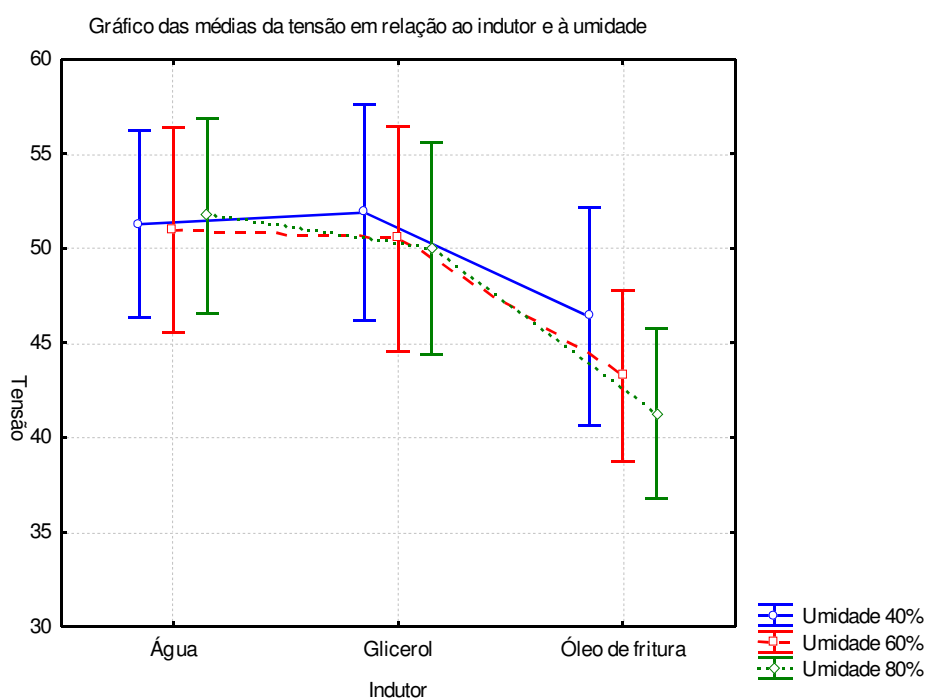


Figura 8. Médias da tensão em relação ao indutor e à umidade.

É importante ressaltar que a solução umedecedora e o tempo de fermentação foram os parâmetros (fatores) que não contribuíram com seus efeitos para o comportamento da tensão superficial, pois não ocorreu nenhuma mudança significativa de tensão quando usados esses parâmetros para avaliação. Desta forma, foram analisadas as variáveis que mais contribuíram, ou seja, usou-se a água como umedecedor e tempo de 48 horas de fermentação em todos os casos.

A utilização do tempo de fermentação de 48 horas pode ser considerada extremamente vantajosa, visto que a literatura cita tempos ótimos de fermentação em estado sólido bem maiores do que o encontrado neste trabalho. Além disso, tem a vantagem de que esse tempo de fermentação se aproxima dos utilizados na

produção em estado submerso e também, quanto menor o tempo para se produzir ou gerar uma menor tensão superficial, com certeza acarretará em uma economia de custo no processo.

6.1.2 Produção de biossurfactante (peso)

A Tabela 4 mostra os resultados da ANOVA fatorial para o comportamento linear e quadrático das variáveis independentes em relação ao peso bruto do biossurfactante produzido.

Os resultados da ANOVA mostram efeito significativo linear do substrato, umedecedor, umidade e tempo e efeito significativo quadrático do substrato, umidade e tempo.

Tabela 4. Resultados da ANOVA fatorial para a produção de biossurfactante.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L)	21,00	<0,001
Substrato (Q)	8,30	0,004
Umedecedor (L)	8,13	0,005
Umedecedor (Q)	0,04	0,841
Indutor (L)	1,28	0,260
Indutor (Q)	2,86	0,093
Umidade (L)	23,66	<0,001
Umidade (Q)	7,14	0,008
Tempo (L)	6,37	0,012
Tempo (Q)	7,73	0,006
Substrato (L+Q)	14,65	<0,001
Umedecedor (L+Q)	4,08	0,019
Indutor (L+Q)	2,07	0,130
Umidade (L+Q)	15,40	<0,001
Tempo (L+Q)	7,05	0,001

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 17 produziram acima de 1 g/L, sendo 7 acima de 2 g/L. A melhor variável encontrada foi: trigo + manipueira + água + 80% umidade em 72 horas, a qual produziu 7,3 g/L, seguida da produção de 4,4 g/L originada na variável: trigo + manipueira + água + 80% de umidade em 48 horas e seguida trigo + manipueira + óleo de fritura + 60% de umidade + 48 horas com uma produção de 3,5 g/L. Entre elas um fator em comum: manipueira utilizada como umedecedor, demonstrando este ser este um dos principais fatores que pode contribuído para uma maior produção de biossurfactante.

A Figura 9 mostra o gráfico de pareto dos efeitos significativos das variáveis independentes em relação ao peso.

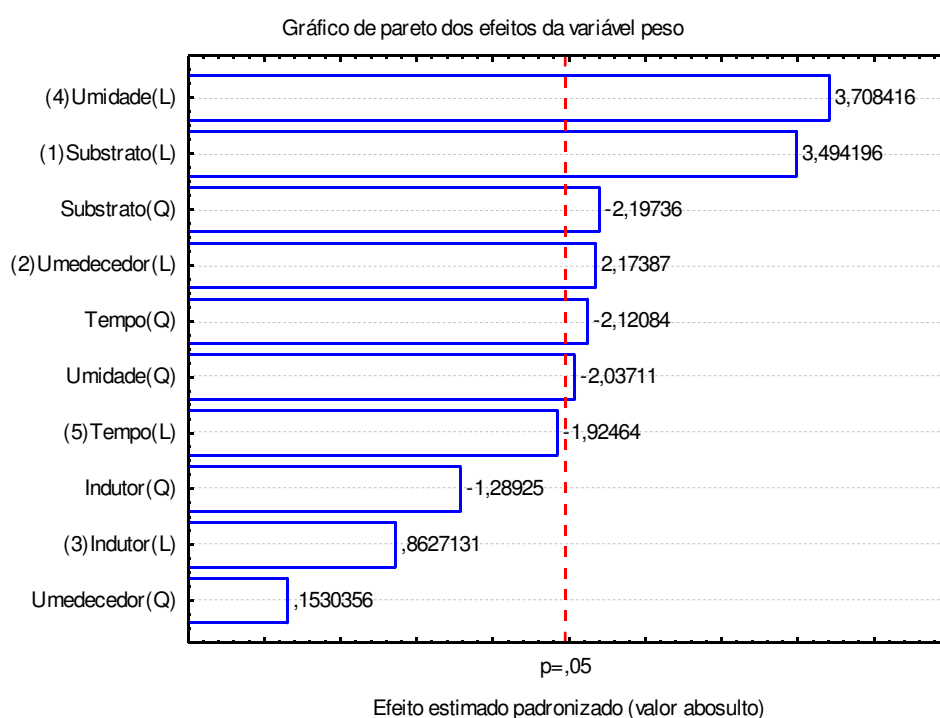


Figura 9. Gráfico de pareto dos efeitos em relação à variável peso.

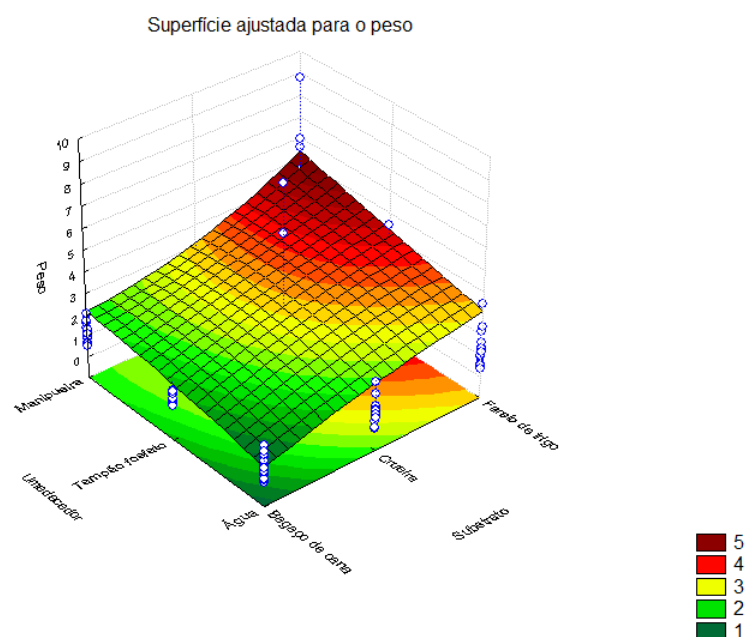


Figura 10. Superfície dos valores da variável produção bruta (peso - g/L) em relação ao substrato e umedecedor.

A superfície (Figura 10) mostra que as maiores produções de biossurfactante se concentram na região a qual a fermentação ocorreu com o substrato de farelo de trigo (maior fonte de nutrientes) e com a manipueira como umedecedor (maior fonte de nutrientes). Esse resultado foi possível de ser observado considerando água como indutor, umidade de 80% e tempo de 48h de fermentação.

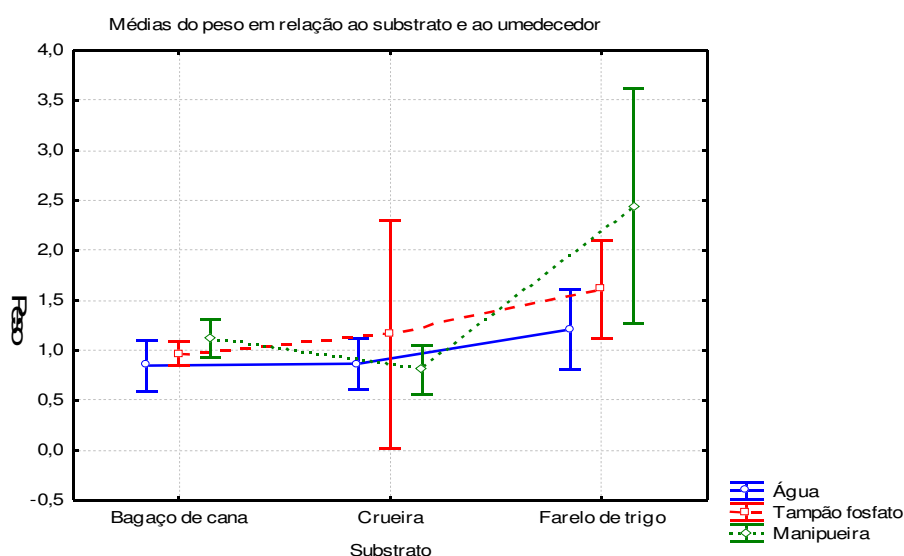


Figura 11. Médias da produção bruta de biossurfactante (g/L) em relação ao substrato e ao umedecedor.

Esse gráfico mostra que a maior quantidade de biossurfactante (com maior variação) está vinculada à utilização de farelo de trigo como substrato (maior teor de nutrientes) e manipueira como umedecedor (maior teor de nutrientes).

Os resultados encontrados neste trabalho podem ser explicados pela afirmação de Levišauskas et al.,(2004) que mencionam que a concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para taxa de crescimento celular são os principais fatores que influenciam a produção de biossurfactante, uma vez que a produção de biossurfactante é dependente do tipo, da quantidade e qualidade da fonte de carbono, da concentração de N, P, Mg, Fe e Mn no meio.

Íons fosfato e fontes de nitrogênio também podem afetar a produção de biossurfactante (LIN, 1996, NITSCHKE, 2004).

Com relação à umidade utilizada nas fermentações que obteve os melhores resultados, pode-se notar que dentre as variáveis estudadas, é necessária uma umidade mínima de 60% para um aumento da produção de biossurfactante.

Ou seja, a umidade influenciou a produção do biossurfactante e, conseqüentemente, a tensão superficial. Em FES, o substrato deve estar devidamente umedecido a ponto de formar um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas do substrato devem haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor para permitir o crescimento e o metabolismo do micro-organismo. Quando isso não acontece, seja por possuírem teores reduzidos ou teores elevados de umidade ou até mesmo por má distribuição na embalagem da fermentação, pode causar um baixo crescimento bacteriano e influenciar negativamente na produção do biossurfactante.

A superfície de resposta (Figura 12) mostra que os maiores valores de produção estão localizados na região do substrato farelo de trigo (maior teor de nutrientes) e umidade de 80%, considerando a manipueira como umedecedor, água como indutor e tempo de 48h de fermentação. O gráfico das médias do peso em relação a essas duas variáveis (Figura 13) reitera esse resultado.

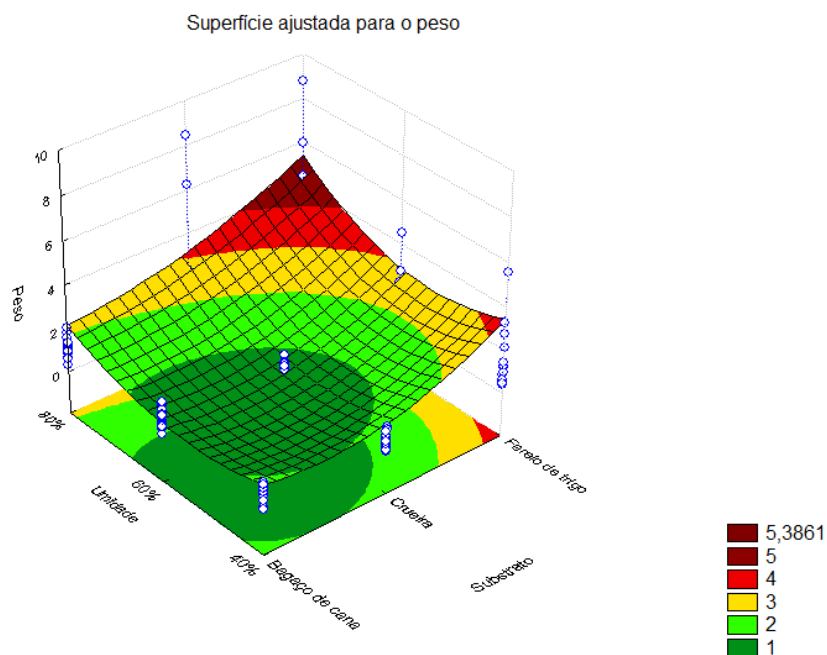


Figura 12. Superfície de resposta da quantidade de biossurfactante em relação ao substrato e à umidade.

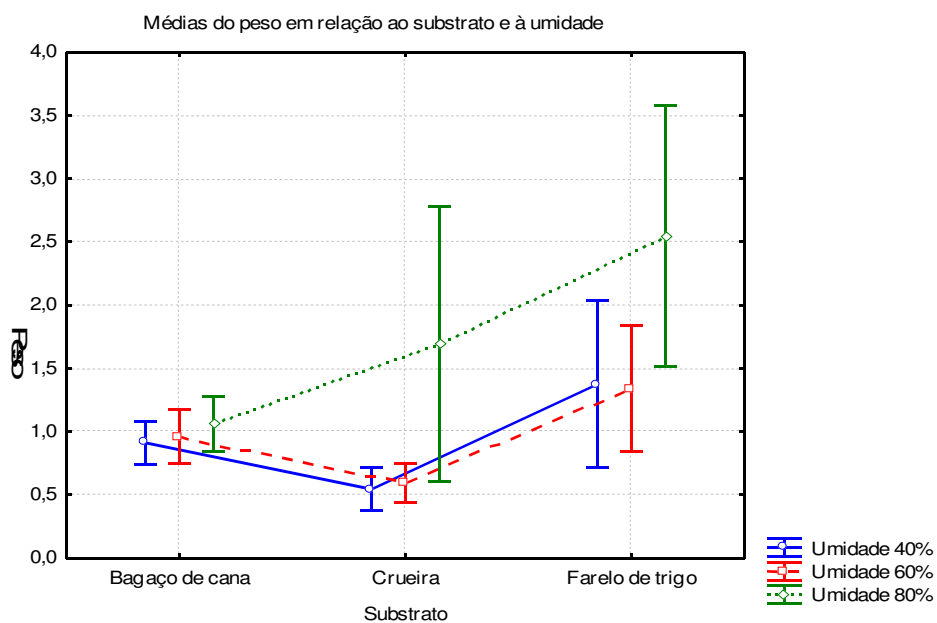


Figura 13. Médias da produção (g/L) em relação ao substrato e à umidade.

É importante ressaltar a alta produção bruta obtida quando foi utilizada a farelo de trigo como substrato e a umidade de 80%, resultado esse que também pode ser visualizado na superfície ajustada.

Nesse caso, considerando a manipueira como umedecedor, glicerol como indutor e 48h de fermentação, os menores valores de peso se concentraram na região de menor umidade, utilizando crueira como substrato.

Outra coisa em comum dentre estas melhores variáveis obtidas, é que em nenhuma delas o tempo de fermentação foi de 96 horas. Pela diferença dos valores, é possível indicar o tempo de fermentação em 48 horas, o que pode ser considerado extremamente vantajoso pois, quanto menor o tempo para se produzir, com certeza acarreta em uma economia de custo no processo.

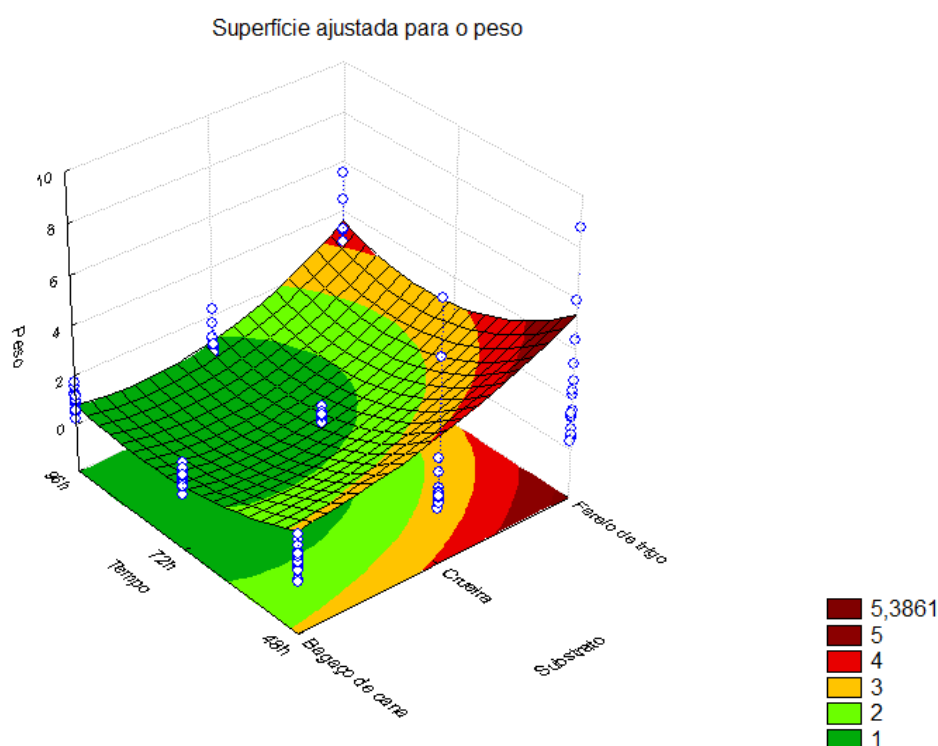


Figura 14. Superfície do peso em relação ao substrato e ao tempo.

A Figura 14 mostra que as maiores produções estão vinculadas ao farelo de trigo como substrato (maior fonte de nutrientes para o microrganismo) e ao menor tempo de fermentação – 48h, considerando a manipueira como umedecedor, umidade de 80% e água como indutor.

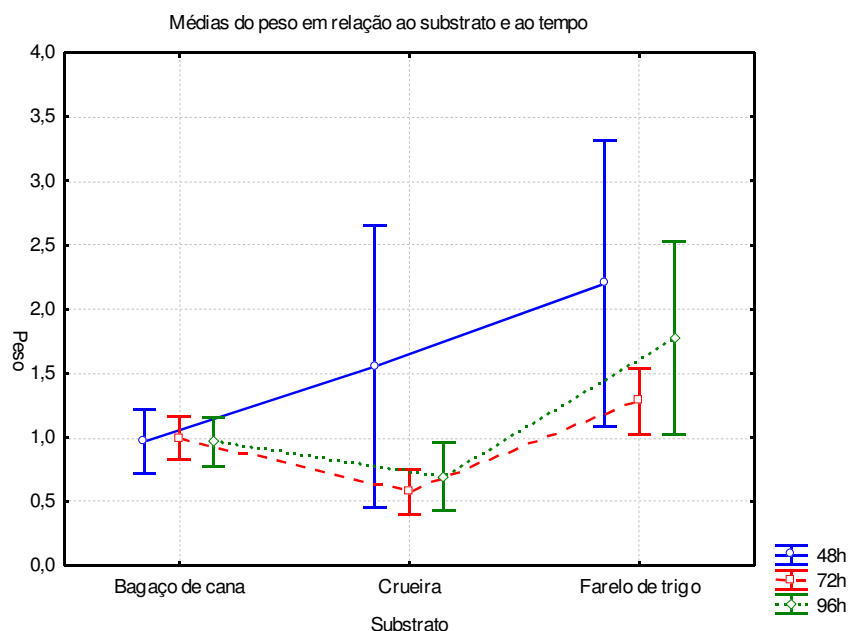


Figura 15. Médias do peso em relação ao substrato e ao tempo.

É interessante verificar (Figura 15) que os valores produção bruta de biossurfactante utilizando tempo de 48h e crueira como substrato são altos também, porém menores em comparação ao uso de farelo de trigo como substrato. Além disso, os menores valores de produção estão determinados pelo uso da crueira como substrato em tempos de fermentação elevados (72h e 96h).

Para o substrato crueira, apenas 5 experimentos apresentaram produções acima de 1 g/L, sendo que somente uma obteve produção maior de 2 g/L que foi na variável: crueira + tampão + óleo + 80% + 96 horas de fermentação com produção de 7,3 g/L.

Já com relação ao substrato bagaço de cana, 13 variáveis obtiveram valores de produção acima de 1 g/L, porém nenhuma variável produziu mais do que 1,6 g/L de biossurfactante.

Em um estudo de produção de biossurfactante utilizando fermentação em estado sólido e submersa com cepas de *Bacillus*, sendo uma *Bacillus subtilis*, Bugay (2009) relatou que, quando utilizou substratos alternativos, verificou que a utilização de substratos pobres em proteínas (bagaço de cana de-açúcar, bagaço de mandioca, farelo de milho, palha de arroz e espuma de poliuretano) não apresentou bons resultados, o que coincide com os resultados deste trabalho.

Os resultados da superfície (Figura 16) mostram maior produção utilizando tampão fosfato como umedecedor e 80% de umidade. Os resultados da produção para a mesma umidade utilizando manipueira também foram expressivos. Esses resultados foram possíveis considerando farelo de trigo como substrato, água como indutor e 48h de fermentação.

A Figura 17 mostra as médias da produção em relação ao umedecedor e à umidade e os resultados mostram que a produção utilizando 80% de umidade é praticamente equivalente quando se compara o tampão fosfato e a manipueira como umedecedores, porém a manipueira tem a grande vantagem de ser um resíduo agroindustrial.

Nesse caso, pode-se pressupor também que a utilização de um umedecedor com menor teor de nutrientes pode resultar em pesos consideráveis, diminuindo o custo do tratamento fermentativo.

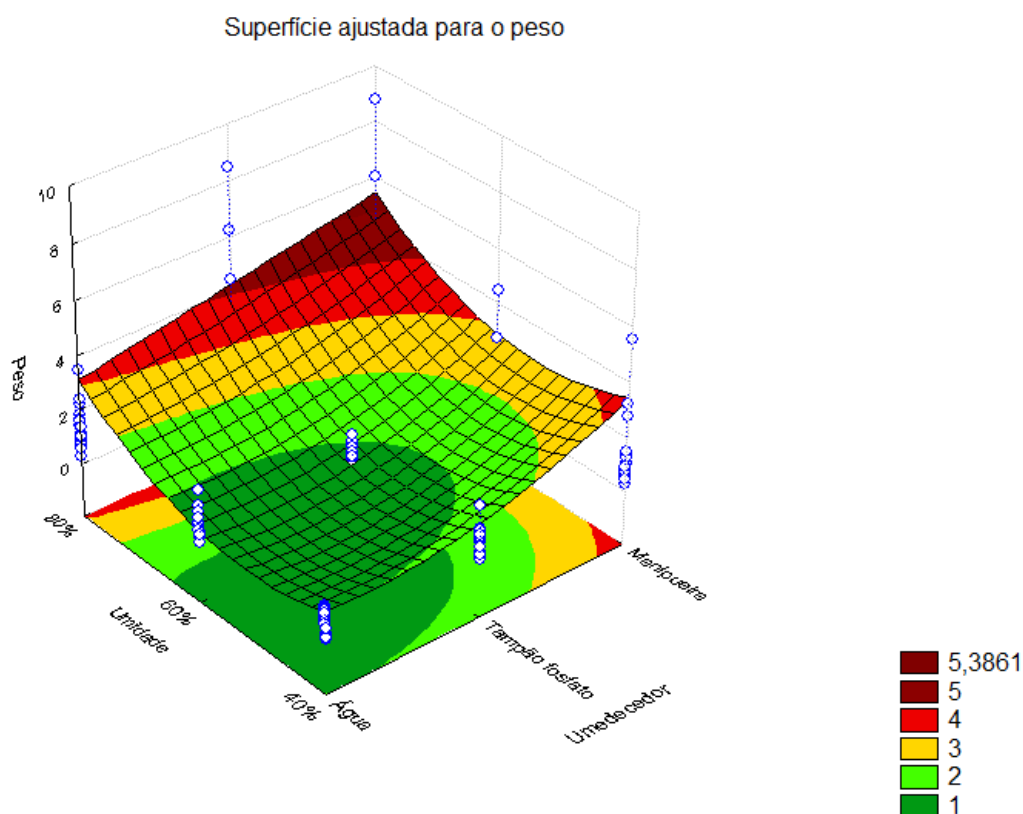


Figura 16. Superfície do peso em relação ao umedecedor e à umidade.

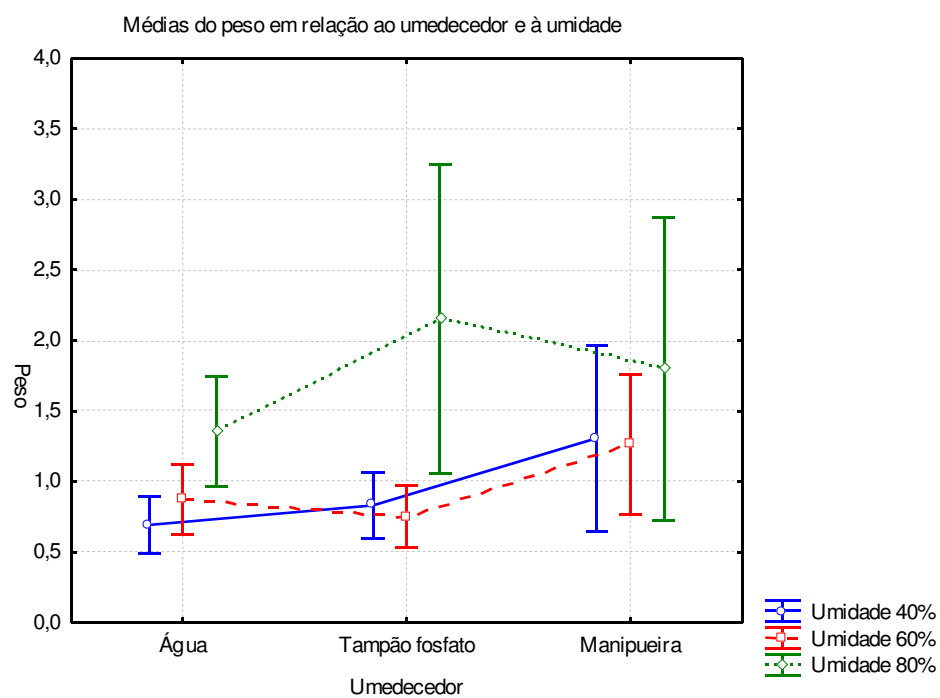


Figura 17. Médias do peso em relação ao umedecedor e à umidade.

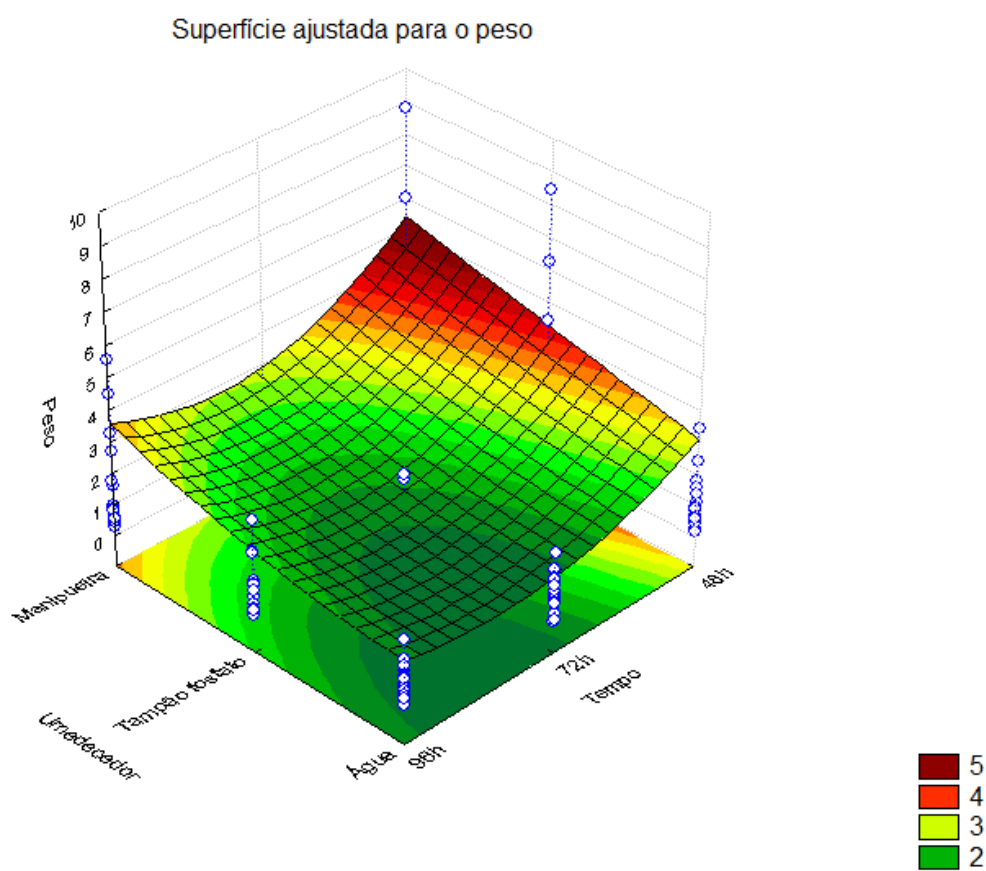


Figura 18. Superfície do peso em relação ao umedecedor e ao tempo.

As maiores produções (Figura 18) estão vinculadas ao menor tempo de fermentação (48h), utilizando o tampão fosfato ou a manipueira como umedecedores. Esse resultado está vinculado ao fato de utilizar o farelo de trigo como substrato, água como indutor e 80% de umidade.

A Figura 19 mostra o gráfico das médias do peso em relação a essas variáveis e é possível notar que tanto a utilização do tampão fosfato como da manipueira como umedecedores pode ser realizada para se obter produções satisfatórias. Assim, é melhor a utilização de um umedecedor que possui um custo menor, seja um resíduo e que também colabora no problema ambiental de descarte de resíduos e pode promover um bom resultado para a produção de biossurfactante, gerando uma economia no processo fermentativo.

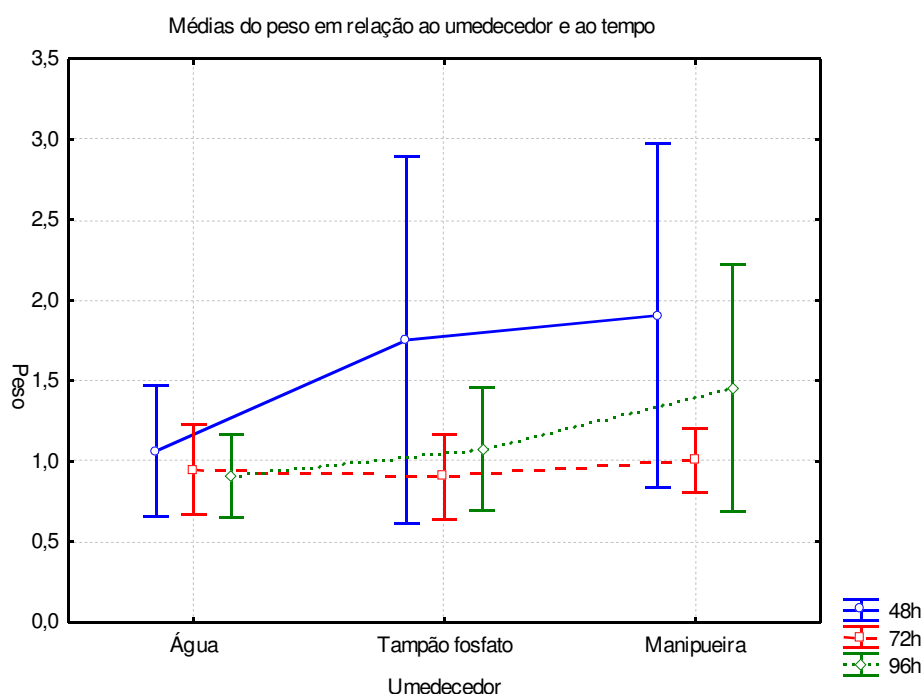


Figura 19. Média dos pesos em relação ao umedecedor e ao tempo de fermentação.

A superfície de resposta (Figura 20) nos revela um fator novo a ser explorado, nota-se que o ponto ótimo para produção de biossurfactante com relação a umidade pode estar em valores acima de 80% (valor máximo estipulado neste projeto) fato este que desconhecíamos até o presente momento, devido a ausência de estudos

envolvendo esses substratos. Estes valores devem nortear futuros estudos visando um aumento na produção de biossurfactante.

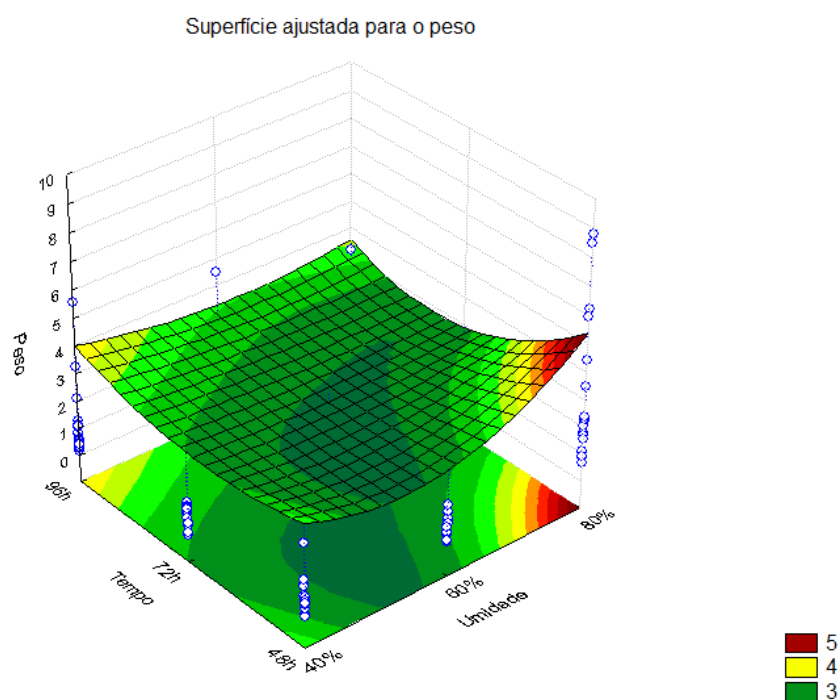


Figura 20. Superfície do peso em relação à umidade e ao tempo.

Os resultados mostram que a maior produção bruta de biossurfactante é verificada utilizando 80% de umidade e 48h de fermentação, sendo considerado o farelo de trigo como substrato, a manipueira como umedecedor e a água como indutor.

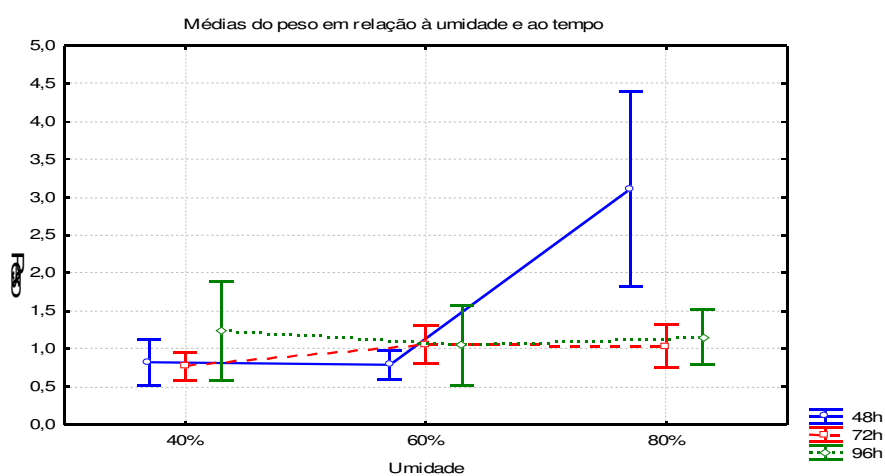


Figura 21. Médias da produção (g/L) em relação à umidade e ao tempo.

O gráfico das médias (Figura 21) mostra esse mesmo resultado, mostrando que a maior umidade e o menor tempo de fermentação promovem maior produção bruta.

Nitschke (2004) produziu biossurfactante a partir de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato e obteve como melhor produção bruta o valor 3,7 g/L em 48 horas de fermentação.

De uma forma geral é importante ressaltar que, para todas as análises, os dados apresentaram maior ajuste ao modelo quadrático.

Para a produção, em todas as análises, foi verificada a utilização de água como a não presença de indutores, otimizando economicamente o processo de fermentação, visto que o indutor foi a única variável que não apresentou interação significativa com o peso.

6.1.3 Índice de emulsificação

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).

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 15 apresentaram valores de índice de emulsificação que mantiveram pelo menos 50% da emulsão original, e, dentre essas, 12 variáveis mantiveram o valor de índice de emulsificação maior que 60% após as 24 horas da sua formação.

As melhores variáveis encontrada, trigo + manipuera + óleo de fritura + 80% de umidade em 96 horas de fermentação e trigo + manipueira + água + 80% em 72 horas de fermentação, obtiveram uma média de 67,5% da emulsão original mantida após 24 horas.

A Tabela 5 mostra os resultados da ANOVA fatorial para o comportamento linear e quadrático das variáveis independentes.

Os resultados da Tabela ANOVA mostram influência linear significativa do substrato sólido e da umidade no com relação ao índice de emulsificação e influência quadrática significativa do substrato e do indutor.

Tabela 5. Resultados da ANOVA fatorial para o índice de emulsificação.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L)	299,71	<0,001
Substrato (Q)	90,91	<0,001
Umedecedor (L)	0,57	0,451
Umedecedor (Q)	0,002	0,961
Indutor (L)	3,89	0,051
Indutor (Q)	31,87	<0,001
Umidade (L)	8,02	0,005
Umidade (Q)	0,78	0,378
Tempo (L)	0,16	0,690
Tempo (Q)	0,41	0,522
Substrato (L+Q)	195,31	<0,001
Umedecedor (L+Q)	0,28	0,751
Indutor (L+Q)	17,88	<0,001
Umidade (L+Q)	4,40	0,014
Tempo (L+Q)	0,28	0,752

Entre todas as melhores variáveis encontradas, um fator em comum: nenhuma das variáveis que obtiveram valores acima de 60% tinha o glicerol como indutor na sua fermentação. Nas variáveis em que foi utilizado o glicerol como indutor, estas não conseguiram nem manter 50% da sua formação original, demonstrando que este indutor pode ser prejudicial para uma produção e/ou manutenção da estabilidade no índice de emulsificação.

A Figura 22 mostra um gráfico de pareto com os efeitos resultantes da Análise de Variância de cada uma das variáveis independentes para o índice de emulsificação.

O gráfico da superfície (Figura 23) mostra que os maiores índices de emulsificação são obtidos utilizando o farelo de trigo como substrato (maior fonte de nutrientes), porém, o indutor a ser utilizado pode ser água ou óleo de fritura, e o óleo de fritura (como indutor) ou a água, sendo que esta apresentou maiores índices de emulsificação em comparação com o óleo de fritura.

Além disso, esses resultados foram possíveis de serem verificados considerando água como umedecedor, 80% de umidade (melhor resultado) e 48 horas de tempo de fermentação.

Para os substratos crueira e bagaço de cana, nenhuma das 27 variáveis que cada substrato possui conseguiu manter o índice de emulsificação no valor de 50 % da sua formação original, o que indica que o substrato tem uma grande influência quanto à produção e manutenção das emulsões produzidas pelos biossurfactantes.

A melhor variável encontrada quando utilizado a crueira como substrato foi: crueira + água + óleo de fritura + 60% de umidade em 72 horas de fermentação, onde o índice de emulsificação manteve 45% da sua formação original. Após esse resultado, apenas 4 variáveis obtiveram valores entre 25 e 36% da manutenção da sua formação, estando o restante bem abaixo desses valores.

E quando o bagaço de cana foi utilizado, os resultados foram ainda menores.

Os melhores resultados deste substrato foram de 20% da manutenção da formação original. Estes resultados foram encontrados nas seguintes variáveis: bagaço de cana + manipueira + óleo + 80% de umidade em 48 horas de fermentação e bagaço de cana + manipueira + água + 80% de umidade em 96 horas de fermentação. Exceto essas variáveis, as demais obtiveram valores de manutenção em torno de 10-15 %.

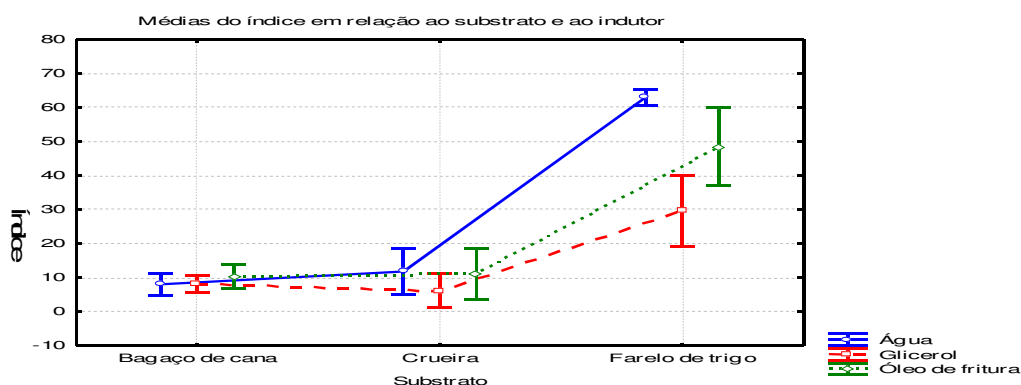


Figura 24. Médias do índice em relação ao substrato e ao indutor.

O gráfico de médias (Figura 24) reitera os resultados da superfície ajustada, ou seja, os maiores índices de emulsificação são verificados quando o farelo de trigo foi utilizado como substrato e a água sem a presença do indutor. Esse resultado pode pressupor que o índice de emulsificação é uma variável dependente que não está relacionada à fonte de carbono disponível no meio, uma vez que, a utilização da água fica caracterizada sem a presença do indutor. Adicionalmente, o índice de emulsificação apresentou menor variação nos dados quando o farelo de trigo foi utilizado juntamente com a água como indutor.

Outra característica em comum dentre as melhores variáveis obtidas foi que em sua quase totalidade todas as variáveis possuíam as umidades de 60 ou 80%.

A Figura 25 mostra a superfície ajustada do índice de emulsificação em relação ao substrato e umidade. A superfície mostra que os maiores valores de índice de emulsificação estão relacionados com o farelo de trigo como substrato (maior teor de nutrientes) e umidade a 80%, considerando água como umedecedor, água como indutor (melhor resultado) e tempo de 48h de fermentação.

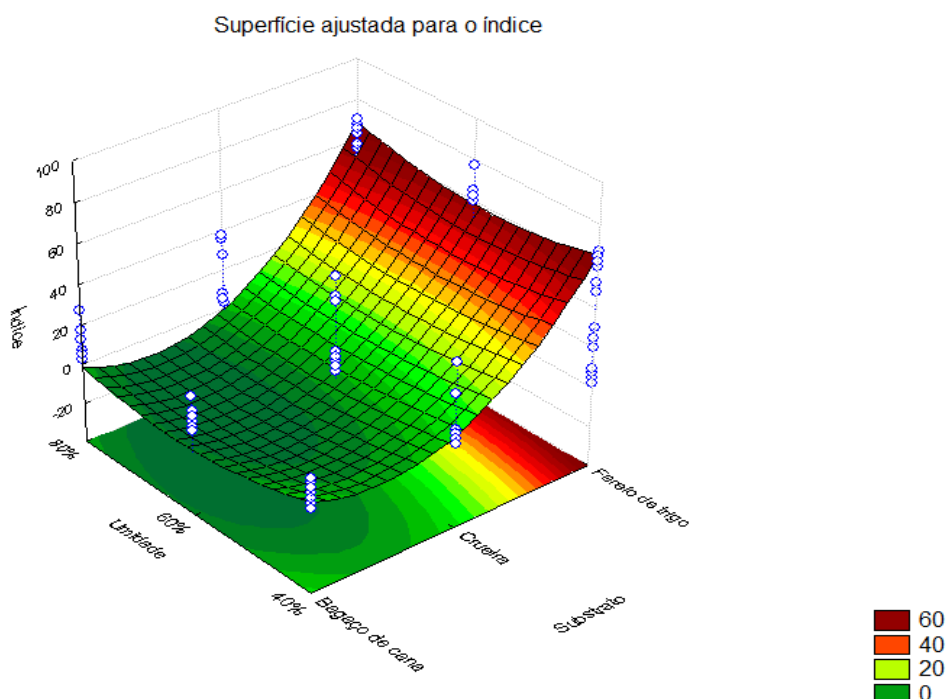


Figura 25. Superfície ajustada do índice em relação ao substrato e à umidade.

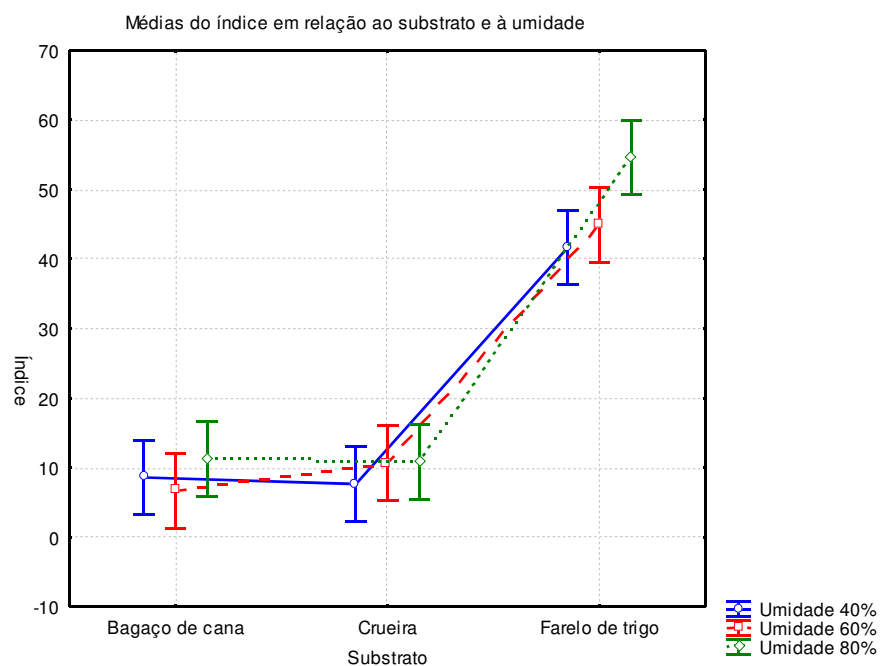


Figura 26. Médias do índice em relação ao substrato e à umidade.

Os maiores valores de índice emulsificação foram relacionados ao farelo de trigo utilizando umidade de 80%, reiterando os resultados expressos na superfície ajustada (Figura 26).

A Figura 27 mostra a superfície do índice de emulsificação em relação ao indutor e à umidade.

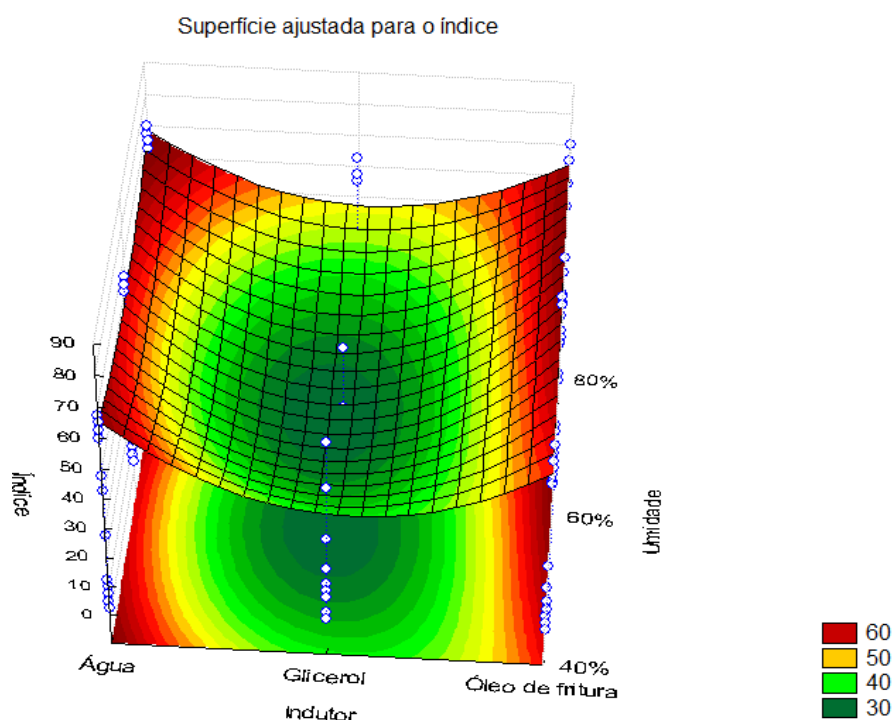


Figura 27. Superfície do índice em relação ao indutor e à umidade.

Os resultados da superfície mostram que os maiores valores de índice de emulsificação se concentram na região de menor fonte de carbono no caso, a água (sem indutor) e maior umidade (80%), considerando o farelo de trigo como substrato, água como umedecedor e 48h como o tempo de fermentação.

A Figura 28 mostra as médias do índice em relação ao indutor e à umidade. Os resultados das médias reiteram os resultados obtidos na superfície do índice quando relacionado com o indutor e a umidade. No entanto, destacam-se os resultados do índice de emulsificação quando se utilizou óleo de fritura como indutor e umidade a 60%, resultando em valores muito próximos quando comparados aos valores da situação ideal descrita acima. Verifica-se, pela superfície, que há uma região de valores altos de índice na utilização de óleo de fritura e umidade próxima a 60%.

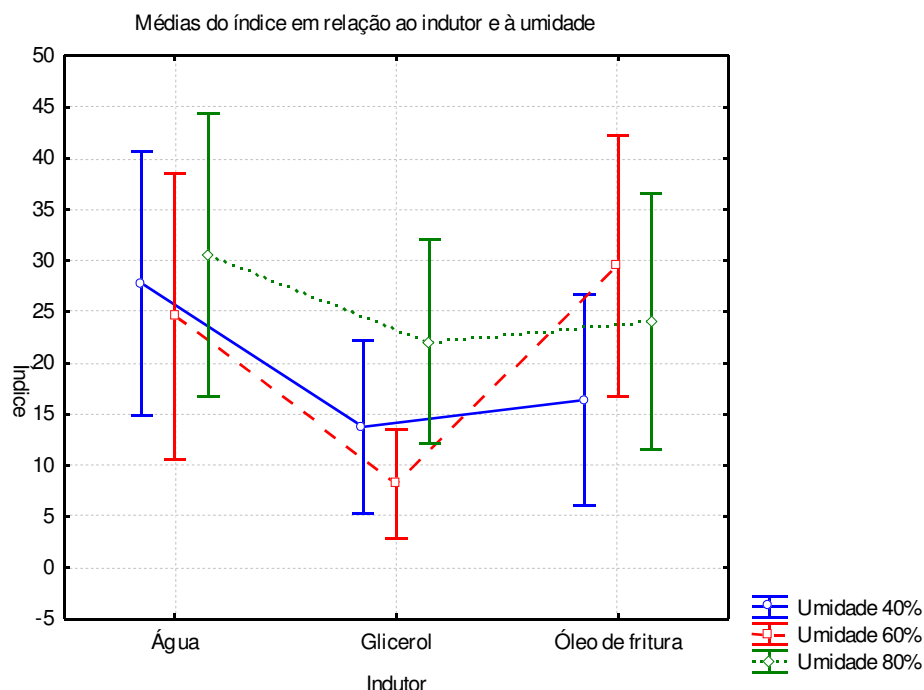


Figura 28. Médias do índice em relação ao indutor e à umidade.

Todos os resultados referentes ao índice de emulsificação foram avaliados fixando os parâmetros de água como umedecedor e 48h de tempo de fermentação, visto que esses parâmetros independentes não contribuíram e/ou não foram significativas no comportamento do índice de emulsificação.

6.1.4 Atividade emulsificante

A atividade emulsificante é expressa em unidades emulsificantes (UE g⁻¹), definida como a massa de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância (Abs) em 1,0 unidade a 610 nm, quando comparada com o branco (CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009).

Segundo Bueno (2008) quanto maior é a densidade ótica maior é a atividade emulsificante.

A Tabela 6 mostra os resultados da ANOVA fatorial para o comportamento linear e quadrático das variáveis independentes em relação à atividade.

Os resultados da Tabela ANOVA mostram a influência linear e quadrática significativa do substrato e do umedecedor na variável atividade emulsificante. Não houve influência significativa das outras variáveis independentes.

Tabela 6. Resultados da ANOVA fatorial para a atividade emulsificante.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L)	13,65	<0,001
Substrato (Q)	19,01	<0,001
Umedecedor (L)	23,44	<0,001
Umedecedor (Q)	4,58	0,034
Indutor (L)	2,98	0,086
Indutor (Q)	1,69	0,195
Umidade (L)	0,004	0,947
Umidade (Q)	0,013	0,908
Tempo (L)	0,31	0,577
Tempo (Q)	0,86	0,353
Substrato (L+Q)	16,33	<0,001
Umedecedor (L+Q)	14,01	<0,001
Indutor (L+Q)	2,34	0,100
Umidade (L+Q)	0,008	0,991
Tempo (L+Q)	0,58	0,556

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 17 apresentaram valores acima de 20 UE g⁻¹, sendo que as variáveis que obtiveram os maiores valores foram: trigo + manipuera + água + 80% de umidade em 72 horas de fermentação com 50 UE g⁻¹ e trigo + tampão + água + 80% de umidade em 96 horas com 40,6 UE g⁻¹. Essas melhores variáveis possuem um fator em comum: a utilização de água como a não utilização de solução indutora. Nessa análise, ocorreu o inverso do que vinha ocorrendo nas outras citadas anteriormente: o substrato farelo de trigo não foi o melhor substrato utilizado para produzir valores altos de atividade emulsificantes.

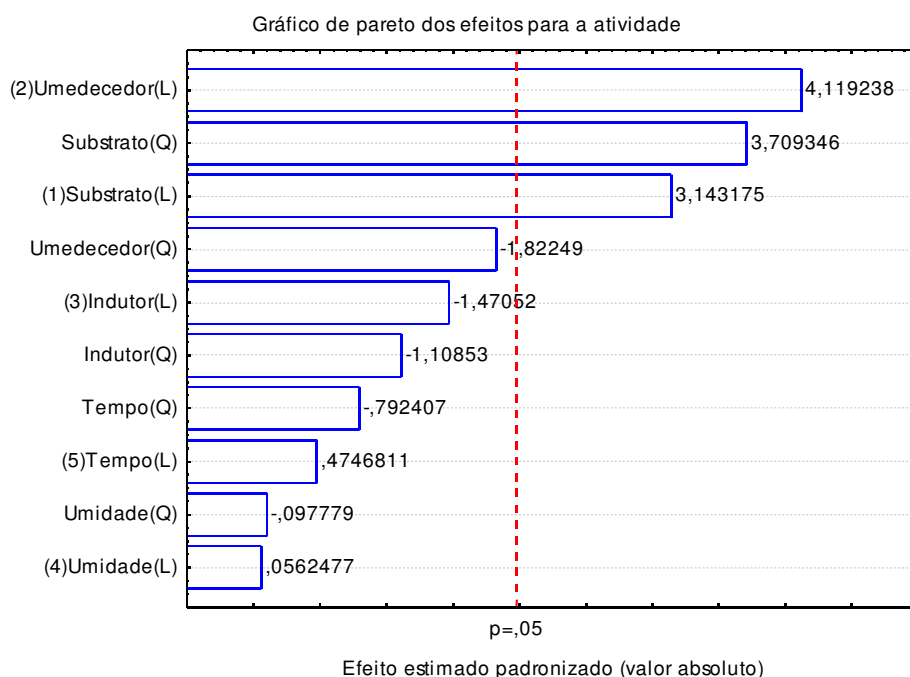


Figura 29. Gráfico de pareto dos efeitos para a atividade.

O gráfico de pareto (Figura 29) reitera os resultados da ANOVA fatorial, mostrando que os efeitos significativos estão relacionados ao substrato e ao umedecedor, sendo o efeito do umedecedor mais significativo do que o do substrato.

Os melhores resultados de atividade emulsificante foram encontrados quando foi utilizado o substrato crueira, ficando algumas variáveis com valores bem acima do que os encontrados com o farelo de trigo. Das 27 variáveis analisadas, 11 obtiveram valores acima de 20 UE g^{-1} . Porém, as duas melhores variáveis: crueira + manipueira + óleo + 60% em 96 horas e crueira + manipueira + água + 60% + 72 horas tiveram uma atividade emulsificante 70 UE g^{-1} e 74 UE g^{-1} respectivamente. E outras variáveis tiveram valores altos, de acima de 40 UE g^{-1} .

Já o bagaço de cana apresentou os piores resultados assim como nas outras análises, tendo na quase na sua totalidade valores bem abaixo de 20 UE g^{-1} , exceto a variável: bagaço + manipueira + óleo + 40% de umidade e 96 horas de fermentação que obteve valores de $32,3 \text{ UE g}^{-1}$.

A Figura 30 mostra a superfície ajustada da atividade emulsificante em relação ao substrato e ao umedecedor. Os maiores valores de atividade emulsificante estão vinculados ao uso da crueira como substrato e da manipueira como umedecedor, sendo considerados os seguintes parâmetros fixos: água como indutor, 40% de umidade e 48h de fermentação.

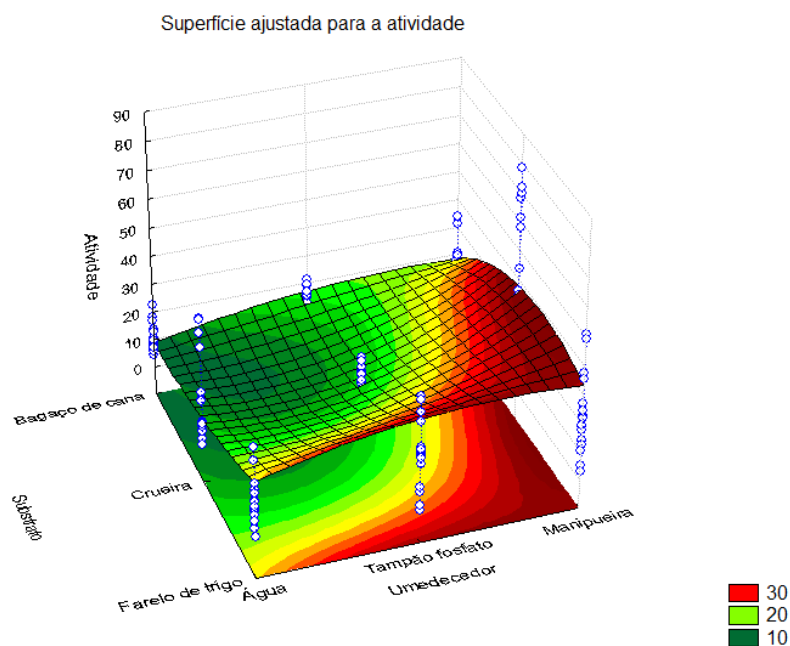


Figura 30. Superfície da atividade em relação ao substrato e ao umedecedor.

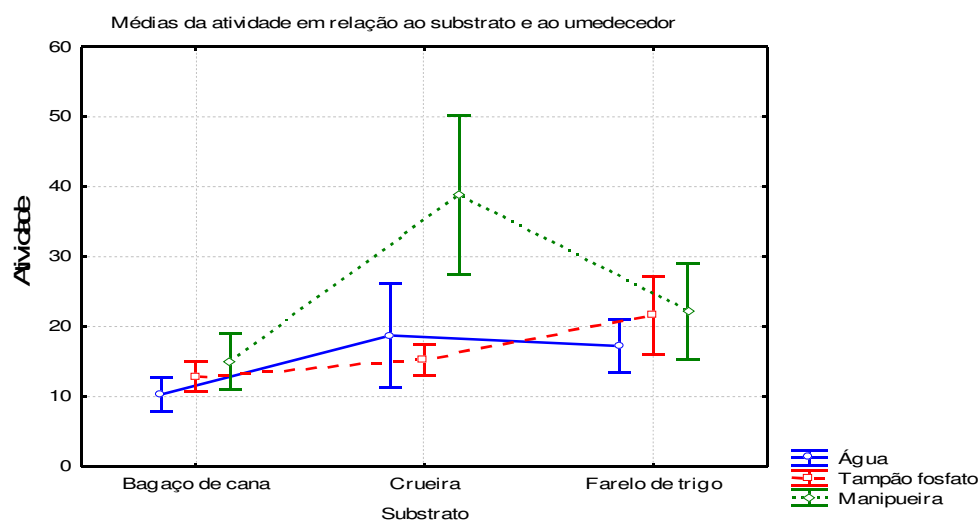


Figura 31. Médias da atividade em relação ao substrato e ao umedecedor.

É possível observar (Figura 31) que o maior valor de atividade é verificado quando se utiliza a crueira como substrato e a manipueira como umedecedor, reiterando os resultados obtidos na superfície. Os menores valores de atividade emulsificante foram verificados quando o bagaço de cana foi usado como substrato.

Os resultados encontrados neste trabalho são melhores do que os encontrados por Johnson et al.(1992) que, estudando a atividade emulsificante

produzida pela *Rhodotorula glutinis* IIP-30 em fermentação estado submerso, obtiveram como melhor resultado o valor de 21,6 UE g⁻¹, quando utilizou a temperatura de 30°C e o tempo de fermentação de 96 horas.

Na literatura não foi encontrada nenhuma referência de produção de biossurfactante em estado sólido que utilizou bactérias e que tenha efetuado esse tipo de análise.

6.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

6.2.1 Tensão Superficial

A Tabela 7 mostra os resultados da ANOVA fatorial para o comportamento das variáveis independentes. O modelo quadrático com interação entre os fatores foi o que apresentou o maior ajuste: R²=0,96407.

Tabela 7. Resultados da ANOVA fatorial para a tensão superficial.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L+Q)	1229,93	<0,001
Umedecedor (L+Q)	22,98	<0,001
Indutor (L+Q)	94,78	<0,001
Umidade (L+Q)	3,40	0,036
Tempo (L+Q)	0,04	0,953
Substrato*Umedecedor	12,56	<0,001
Substrato*Indutor	4,19	0,003
Substrato*Umidade	1,80	0,132
Substrato*Tempo	0,70	0,587
Umedecedor*Indutor	24,91	<0,001
Umedecedor*Umidade	2,36	0,057
Umedecedor*Tempo	0,45	0,772
Indutor*Umidade	3,12	0,017
Indutor*Tempo	1,56	0,189
Umidade*Tempo	6,51	<0,001

Os resultados da Tabela ANOVA mostram influência linear e quadrática de todos os fatores, exceto o tempo, na tensão superficial. Além disso, foi possível

observar interação significativa do substrato com umedecedor e com indutor; do umedecedor com indutor; do indutor com umidade e da umidade com tempo. A tensão superficial apresentou melhores valores utilizando farelo de trigo como substrato, água como umedecedor, óleo de fritura como indutor, umidade a 80% e tempo de 48h de fermentação. Como o tempo não apresentou influência significativa na tensão, para todas as análises foi considerado o menor tempo de fermentação (48 horas) a fim de otimizar o processo.

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 17 apresentaram valores menos de 40 mN/m, sendo a variável trigo + água destilada + óleo de cozinha + 80% de umidade em 72 horas de fermentação obteve uma média de 32 mN/m e trigo + tampão fosfato + óleo de cozinha + 80% de umidade em 48 horas obteve uma média de 33 mN/m.

Estes resultados podem ser considerados satisfatórios, uma vez que os extratos aquosos da FES estavam diluídos, pois, além da solução umedecedora, mais 100 mL de água destilada foram utilizados para extração do biossurfactante dos sólidos fermentados.

A Figura 32 mostra a superfície de resposta da tensão em relação ao substrato e ao umedecedor.

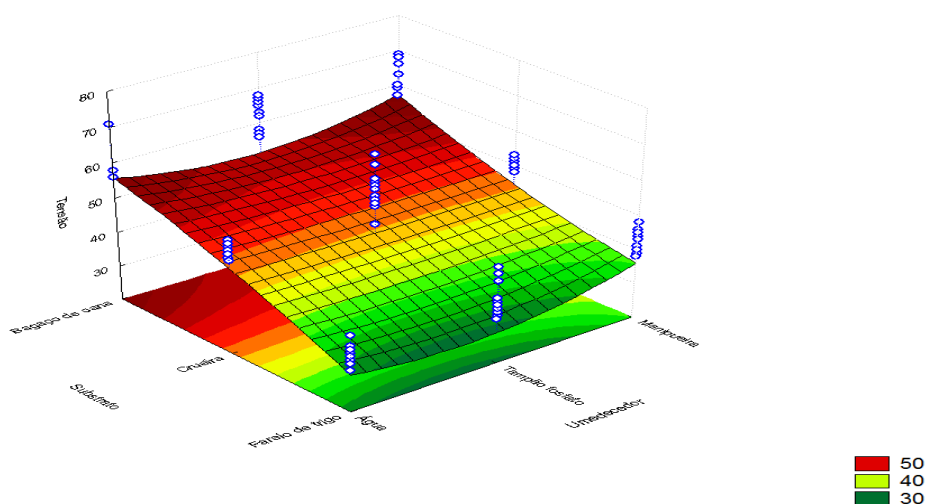


Figura 32. Superfície ajustada para a tensão superficial quando comparada em relação ao substrato e umedecedor.

A superfície mostra que a tensão superficial é menor quando o tratamento é realizado com farelo de trigo como substrato e água como umedecedor,

considerando óleo de fritura como indutor, 80% de umidade e 48h de fermentação. A Figura 33 mostra o gráfico das médias da tensão em relação ao substrato e ao umedecedor.

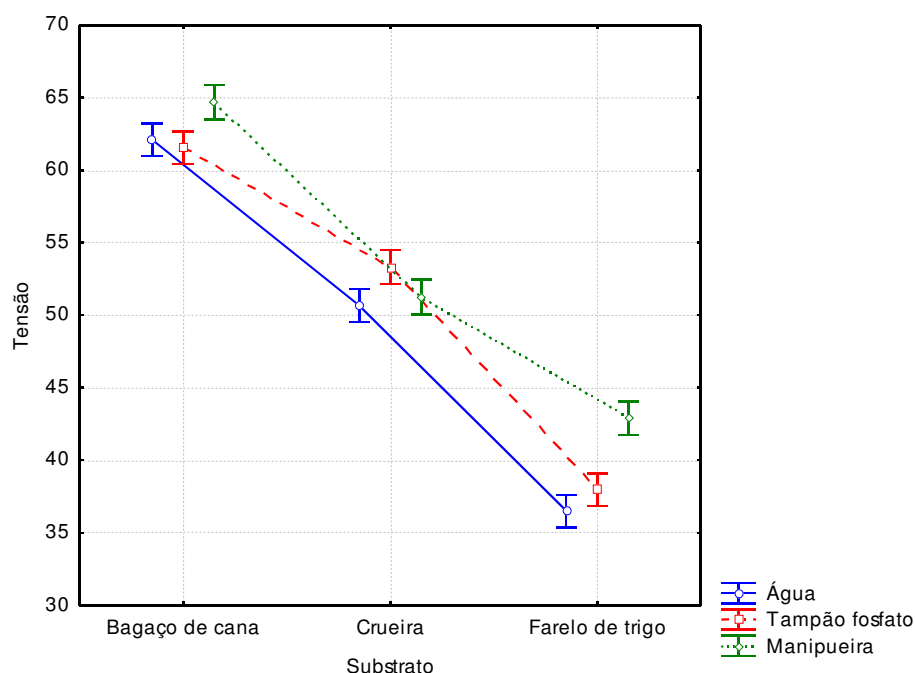


Figura 33. Médias da tensão superficial de acordo com o substrato e o umedecedor.

É possível observar que os menores valores de tensão foram encontrados quando a fermentação é o farelo de trigo como fonte de nutrientes e a água como umedecedor, o que pode ser considerado excelente uma vez que a utilização de água como umedecedor pode baratear os custos de produção.

A Figura 34 mostra o comportamento da tensão em relação ao substrato e ao indutor.

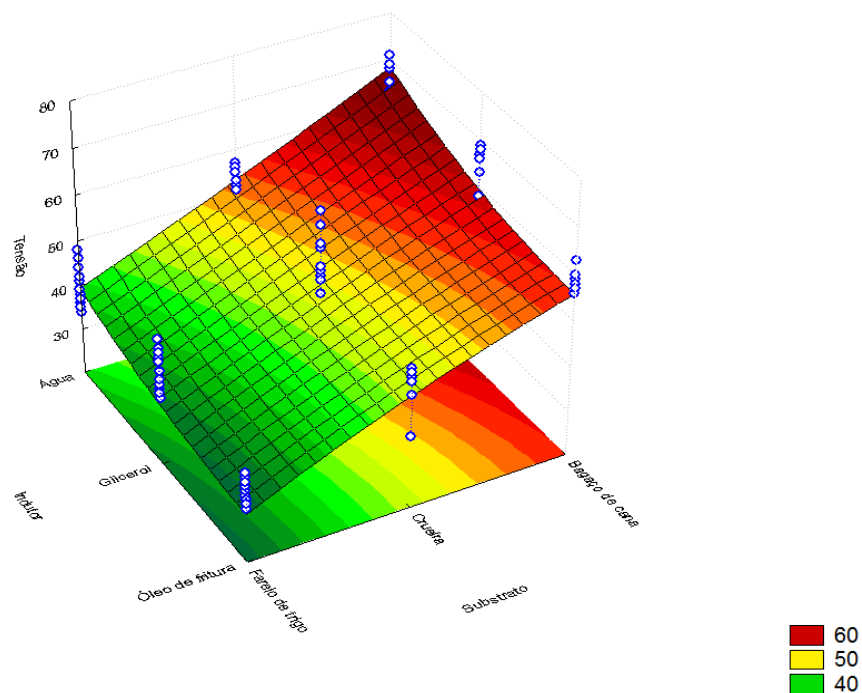


Figura 34. Superfície ajustada para a tensão superficial de acordo com o substrato e indutor.

Verifica-se que os menores valores de tensão superficial foram encontrados utilizando farelo de trigo como substrato e óleo de fritura como indutor, considerando água como umedecedor, umidade de 80% e tempo de 48h.

A Figura 35 mostra as médias da tensão em relação ao substrato e ao indutor.

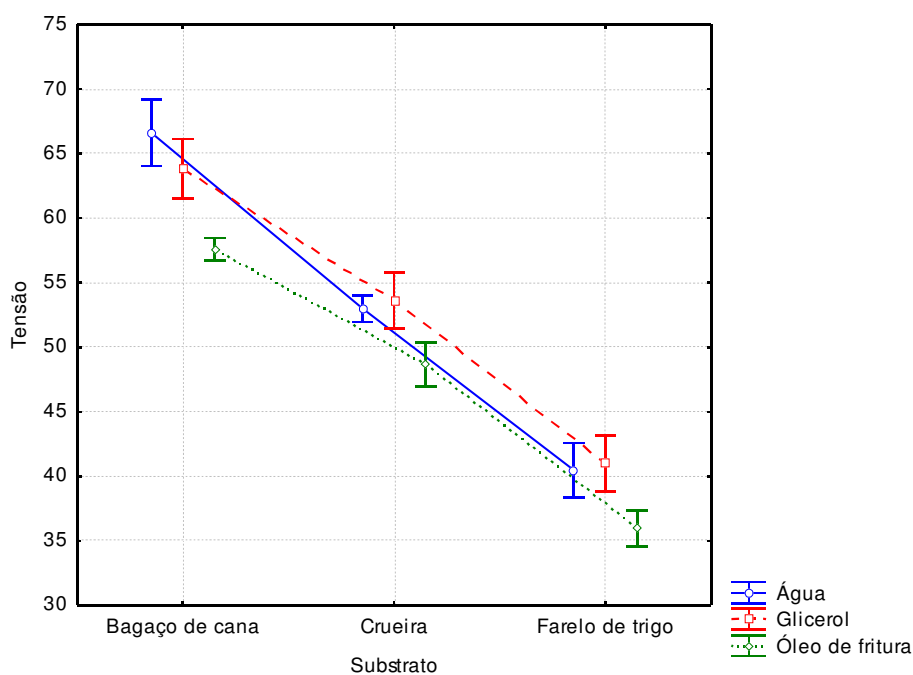


Figura 35. Médias da tensão superficial em relação ao substrato e ao indutor.

Dentre os 17 experimentos (dentro da faixa dos 40 mN/m) estudadas, 9 experimentos utilizando o farelo de trigo como substrato tinham um fator em comum: o óleo de cozinha como indutor (fonte de carbono), demonstrando este ser um dos principais fatores que podem contribuir para uma maior redução da tensão superficial obtida dentre as variáveis utilizando o farelo de trigo como substrato.

A Figura 36 mostra a superfície ajustada da tensão de acordo com o umedecedor e o indutor.

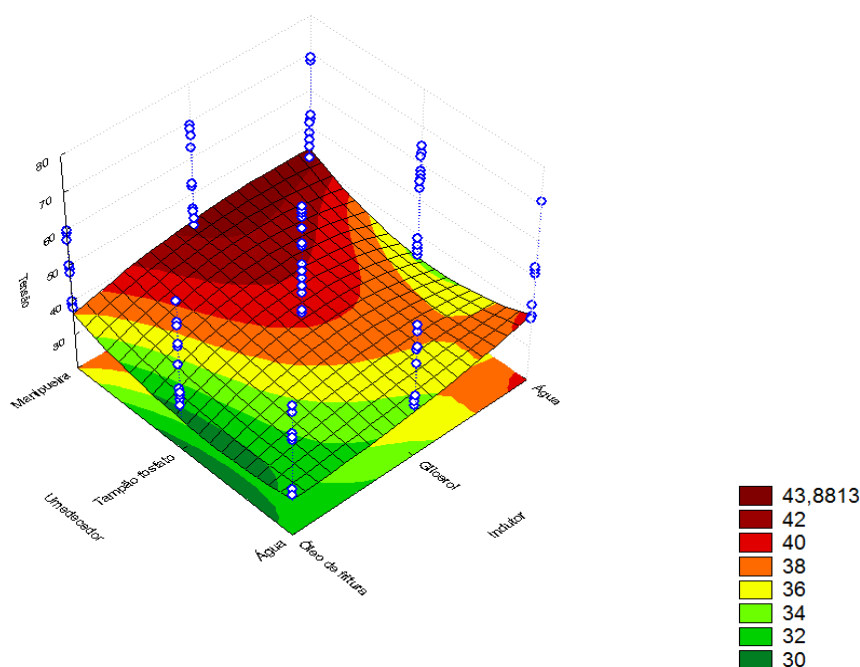


Figura 36. Superfície ajustada da tensão superficial de acordo com umedecedor e indutor.

As menores tensões estão vinculadas ao óleo de fritura como indutor e à água como umedecedor. Nesse caso, vale ressaltar a ação do tampão fosfato como um umedecedor alternativo para a diminuição da tensão superficial, visto que obteve valores de tensão próximos em relação aos valores obtidos utilizando água, porém, o custo do tampão fosfato é mais alto do que a água, portanto a utilização da água pode propiciar uma economia no custo de produção. Essas condições foram observadas utilizando farelo de trigo como substrato, 80% de umidade e 48h de fermentação.

A Figura 37 mostra o comportamento das médias da tensão quando esses parâmetros foram fixados, alterando o umedecedor e o indutor.

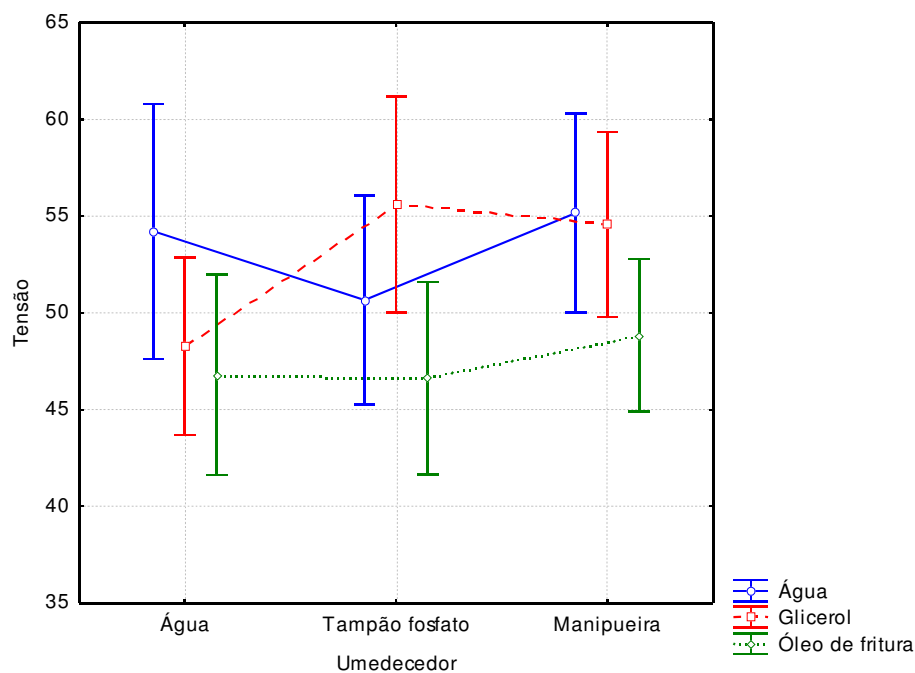


Figura 37. Médias da tensão superficial em relação ao umedecedor e indutor.

Analisando a Figura 37 é possível notar que a tensão superficial é menor quando a fermentação é realizada com farelo de trigo como substrato juntamente com óleo de fritura como indutor e água como umedecedor.

Nesse caso, a tensão está relacionada ao teor de nutrientes do substrato e a disponibilidade de água, ou seja, quanto maior o teor de nutrientes do substrato e disponibilidade de água proporcionará uma menor tensão superficial.

A Figura 38 mostra a superfície ajustada da tensão de acordo com o indutor e a umidade.

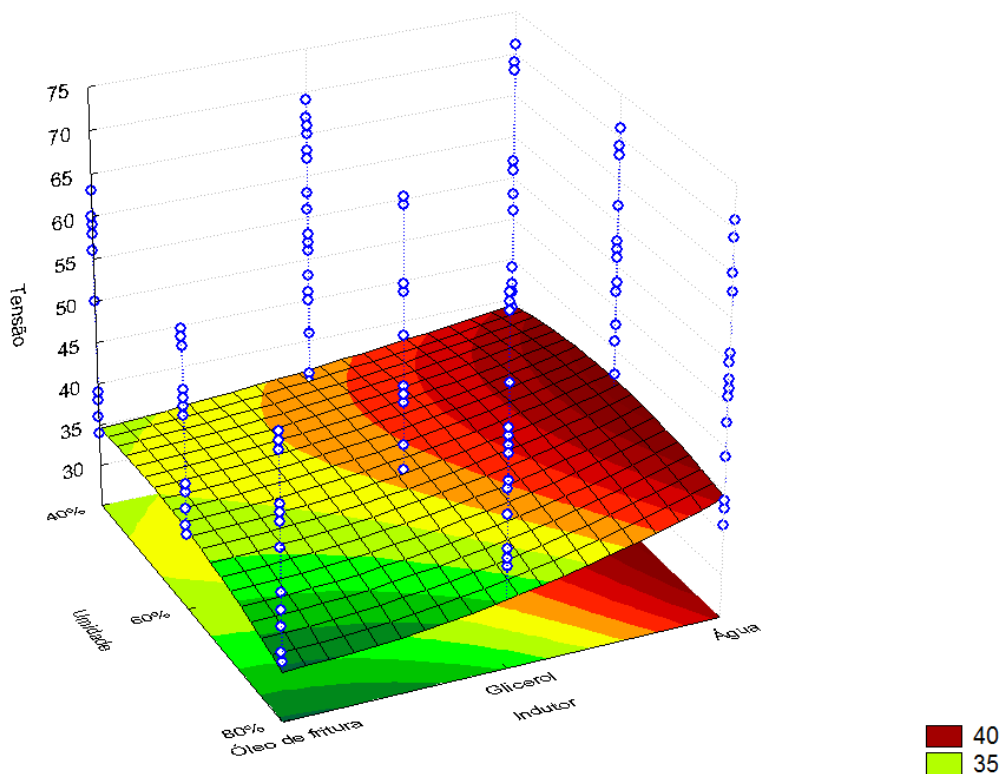


Figura 38. Valores de tensão superficial de acordo com o indutor e a umidade.

Verificam-se menores valores de tensão superficial utilizando óleo de fritura como indutor e umidade a 80%, considerando farelo de trigo como substrato, água como umedecedor e 48h de tempo de fermentação.

A Figura 39 mostra o gráfico das médias da tensão quando o indutor e a umidade são confrontados.

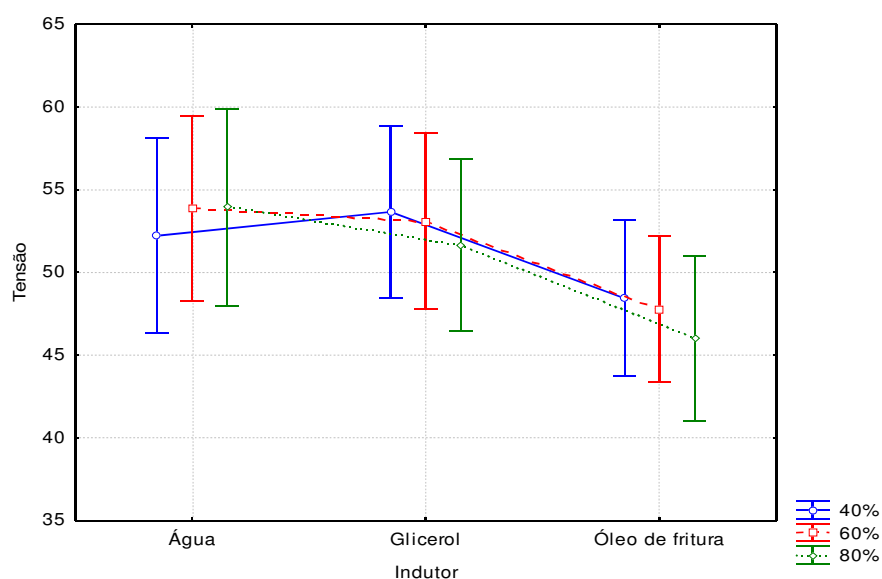


Figura 39. Médias da tensão superficial em relação indutor e à umidade.

Nota-se (Figura 39) que as menores tensões superficiais estão vinculadas quando o óleo de fritura (maior fonte de carbono) é utilizado como indutor e o teor de umidade é de 80%. Além disso, esse resultado está vinculado ao fato de utilizar farelo de trigo como substrato, água como umedecedor e 48 horas de fermentação.

A Figura 40 mostra o comportamento da tensão superficial quando avaliada de forma conjunta com a umidade e o tempo de fermentação.

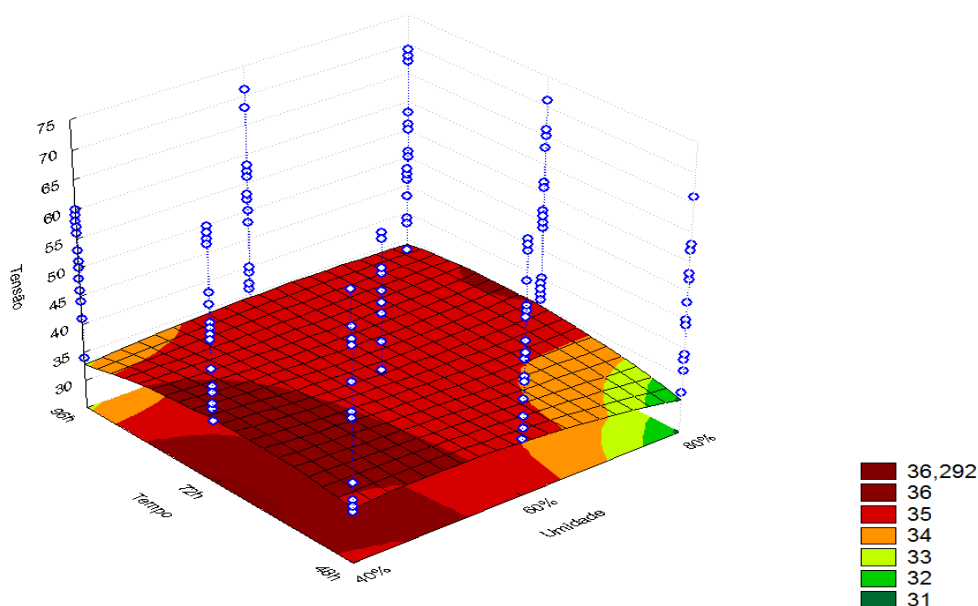


Figura 40. Tensão superficial de acordo com umidade e tempo de fermentação.

É possível observar que se obtêm os menores valores de tensão utilizando 80% de umidade e 48h de tempo de fermentação, considerando farelo de trigo como substrato, água como umedecedor e óleo de fritura como indutor. A Figura 41 mostra o comportamento das médias da tensão em relação a esses dois fatores.

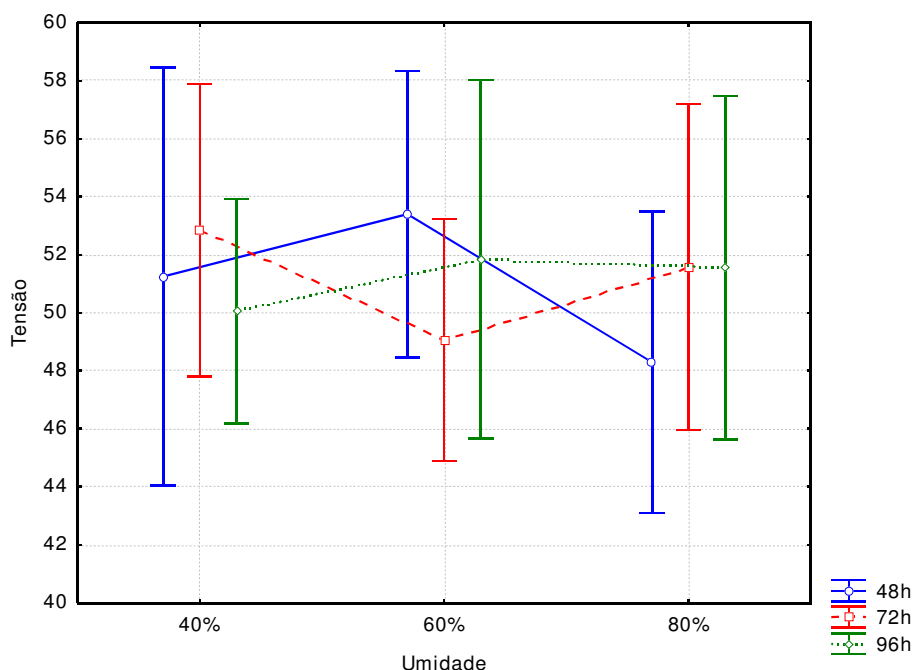


Figura 41. Médias da tensão superficial de acordo com umidade e tempo de fermentação.

Observando a Figura 41 nota-se que os menores valores de tensão superficial foram encontrados quando se utilizou a umidade de 80% e o tempo de fermentação de 48 horas, seguido da umidade de 60% e 72 horas de fermentação, o que pode indicar que o aumento da umidade pode contribuir na diminuição do tempo de fermentação.

A utilização do tempo de fermentação de 48 horas pode ser considerada extremamente vantajosa, visto que a literatura cita tempos ótimos de fermentação em estado sólido bem maiores do que o encontrado neste trabalho. Além disso, tem a vantagem de que esse tempo de fermentação se aproxima dos utilizados na produção em estado submerso e também, quanto menor o tempo para se produzir ou gerar uma menor tensão superficial, com certeza acarretará em uma economia de custo no processo.

A redução de tensão superficial foi melhor do que a encontrada por Fox e Bala (2000), que estudaram a produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando como substrato o resíduo sólido de batata e como resultado obtiveram uma redução da tensão superficial de 43,7 mN/m.

Bugay (2009) estudou a produção de biossurfactante utilizando fermentação em sólido e submerso com cepas de *Bacillus*, sendo uma *Bacillus subtilis* que obteve o melhor resultado de tensão superficial de 36 mN/m.

Para o substrato crueira o melhor valor de tensão superficial encontrado foi de 40,5 mN/m, porém este valor só foi encontrado em uma variável (crueira + tampão fosfato + óleo de fritura + 80% de umidade com 96 horas de fermentação), dentre as 27 variáveis estudadas com este substrato, ficando todas as outras com valores acima de 40 mN/m.

Já com relação ao substrato bagaço de cana, o melhor resultado de tensão superficial foi de 56 N/m, sendo encontrado este valor na variável que utilizou o bagaço + tampão fosfato + óleo de fritura na umidade 60% e 96 horas de fermentação.

Bugay (2009), quando estudou a produção de biossurfactante, relatou que quando utilizou substratos alternativos, verificou que a utilização de substratos pobres em proteínas (bagaço de cana de - açúcar, bagaço de mandioca, farelo de milho, palha de arroz e espuma de poliuretano) não apresentou bons resultados com relação a redução de tensão superficial, assim como neste trabalho.

6.2.2 Produção de biossurfactante (peso)

A Tabela 8 mostra os resultados da ANOVA fatorial para o comportamento linear e quadrático das variáveis independentes em relação ao produção bruta do biossurfactante produzido.

A Tabela 8 mostra os resultados do modelo quadrático com interação entre os fatores para produção bruta, sendo esse modelo o que apresentou o maior ajuste: $R^2=0,6997$.

Tabela 8. Resultados da ANOVA fatorial para a produção bruta de biossurfactante.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L+Q)	46,58	<0,001
Umedecedor (L+Q)	0,79	0,454
Indutor (L+Q)	6,31	0,002
Umidade (L+Q)	6,29	0,002
Tempo (L+Q)	1,82	0,165
Substrato*Umedecedor	5,87	<0,001
Substrato*Indutor	5,83	<0,001
Substrato*Umidade	5,15	<0,001
Substrato*Tempo	3,11	0,017
Umedecedor*Indutor	1,28	0,279
Umedecedor*Umidade	2,42	0,052
Umedecedor*Tempo	2,61	0,038
Indutor*Umidade	3,14	0,017
Indutor*Tempo	3,22	0,015
Umidade*Tempo	1,93	0,109

A produção está centrada no uso do farelo de trigo como substrato, água como umedecedor, óleo de fritura como indutor, 80% de umidade e 48h de fermentação.

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 26 produziram acima de 1 g/L, sendo dessas 10 acima de 2 g/L. A melhor variável encontrada foi: trigo + água + óleo de fritura + 80% de umidade em 72 horas de fermentação, a qual produziu 14,1 g/L, seguido de trigo + manipueira + óleo de fritura + 80% de umidade em 96 horas, que produziu 4,74 g/L, em seguida, trigo + manipueira + óleo de fritura + 40% de umidade em 72 horas, que produziu 4,5 g/L, e por fim, trigo + tampão fosfato + água + 80% em 96 horas que produziu 3,08 g/L.

Entre elas um fator em comum: óleo de fritura utilizado como indutor, demonstrando este ser um dos principais fatores que pode contribuído para uma maior produção de biossurfactante.

Para o substrato crueira 10 variáveis apresentaram produções acima de 1 g/L, sendo que somente uma obteve produção maior de 2 g/L que foi na variável: crueira + água + glicerol + 80% + 72 horas de fermentação com produção de 2,2 g/L.

Já com relação ao substrato bagaço de cana, nenhuma variável obteve valores de produção acima de 1 g/L.

A Figura 42 mostra o comportamento da produção bruta de acordo com substrato e umedecedor.

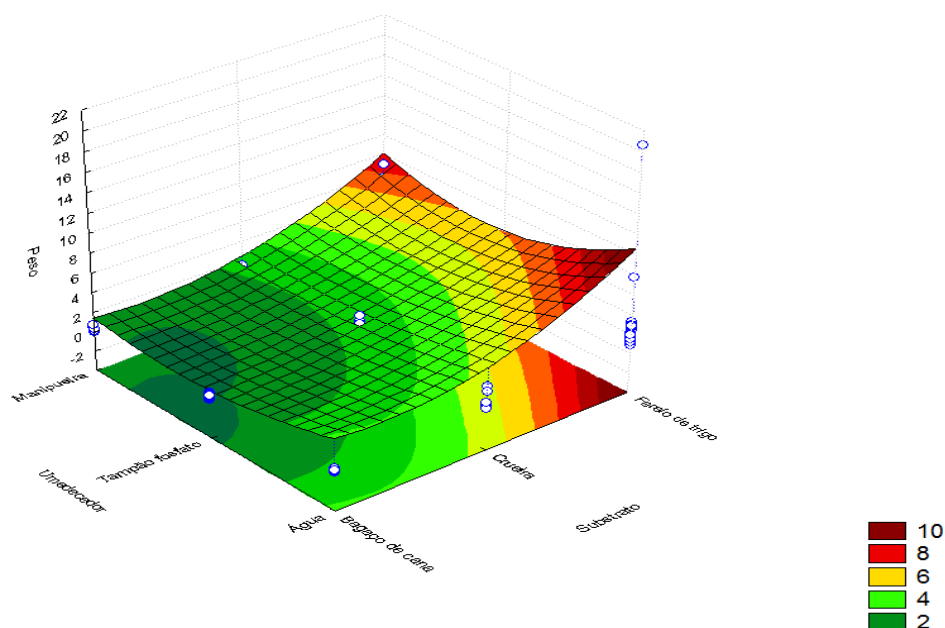


Figura 42. Produção bruta de acordo com substrato e umedecedor.

Os valores de produção bruta encontram-se maiores utilizando farelo de trigo como substrato e água como umedecedor, considerando, óleo de fritura como indutor, 80% de umidade e 48h de tempo de fermentação. As médias do peso para essa condição estão expostas na Figura 43.

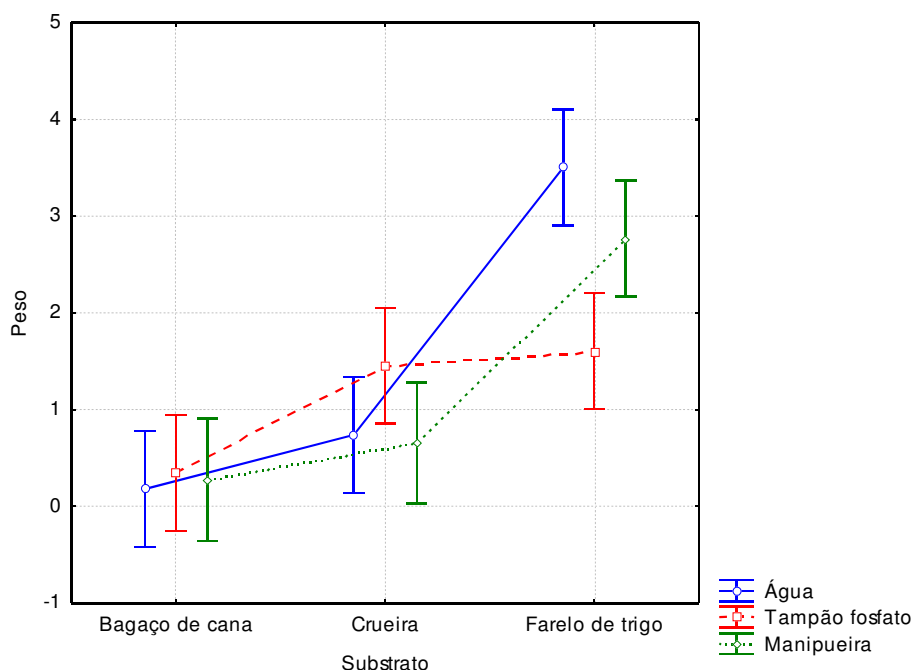


Figura 43. Média da produção bruta de acordo com substrato e umedecedor.

Esse gráfico mostra que a maior quantidade de biossurfactante está vinculado à utilização de farelo de trigo como substrato (maior teor de nutrientes) e água como umedecedor, seguido da manipueira.

Nesse caso, pode-se pressupor também que a utilização de um umedecedor com menor teor de nutrientes pode resultar em produções consideráveis, diminuindo o custo do tratamento fermentativo, além disso a utilização de resíduos agroindustriais, como manipueira, também pode contribuir para uma economia de custos de processo.

A manipueira apresenta elevados índices de carboidratos totais (MARÓSTICA JR, 2007; DAMASCENO et al, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2003), que caracteriza como um bom substrato para a produção de biossurfactantes por *Bacillus* (LIN, 1996). Além disso, a manipueira apresenta elevados teores de Mn^{2+} e Fe^{2+} (MARÓSTICA JR, 2007; DAMASCENO et al, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2003) muito importante para a produção de surfactina (COOPER et al, 1981; WEI; CHU, 2002; WEI et al, 2004). Os íons Fe^{2+} também são considerados importantes para uma boa produção de biossurfactantes (COOPER et al, 1981; WEI et al, 2004), assim como os íons Zn^{2+} e NH_4^+ (GU et al, 2005).

Outros nutrientes que podem afetar a produção são íons fosfato e fontes de nitrogênio, sendo o farelo de trigo o substrato mais pesquisado e utilizado para a FES por ser uma excelente fonte de carbono e nitrogênio (SILVEIRA, 2007).

A Figura 44 mostra o comportamento da produção de acordo com substrato e indutor.

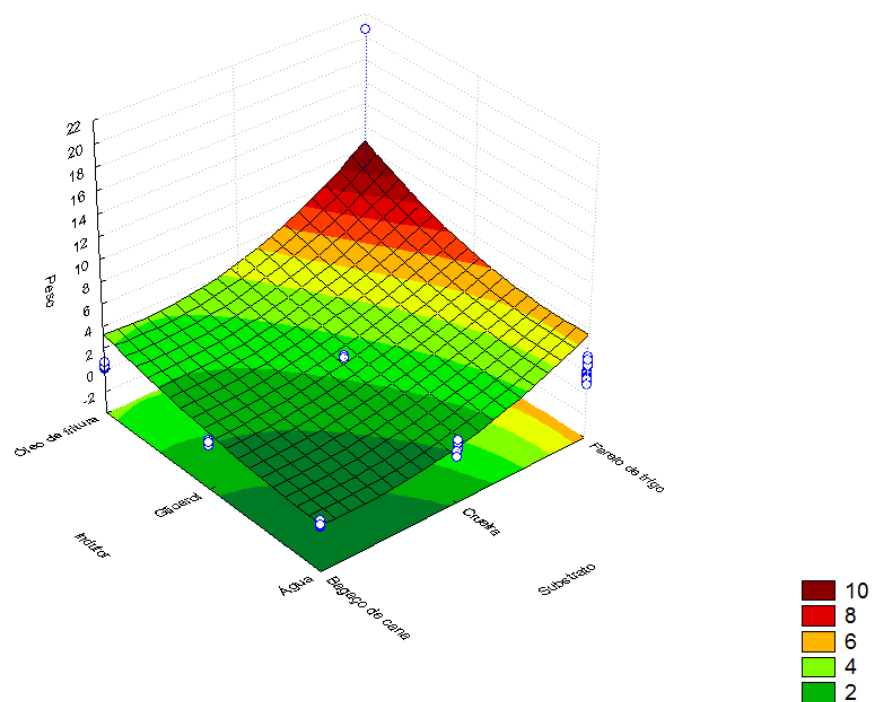


Figura 44. Produção de acordo com substrato e indutor.

Nota-se que os maiores valores de produção são obtidos quando se utiliza farelo de trigo como substrato e óleo de fritura como indutor, considerando água como umedecedor, 80% de umidade e 48h de fermentação. As médias de produção para essa condição estão na Figura 45.

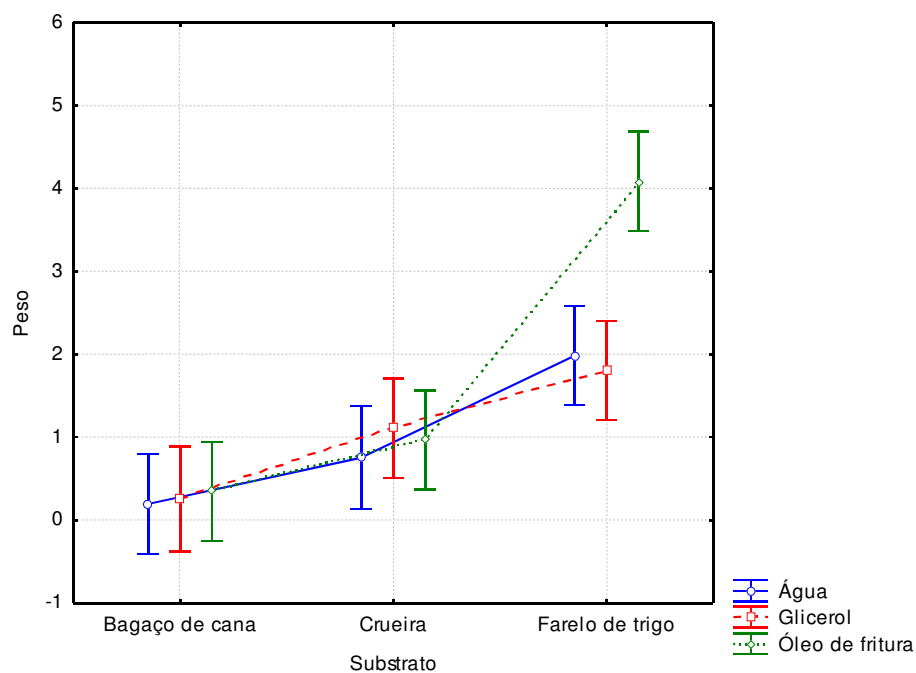


Figura 45. Médias de produção para a combinação substrato e indutor.

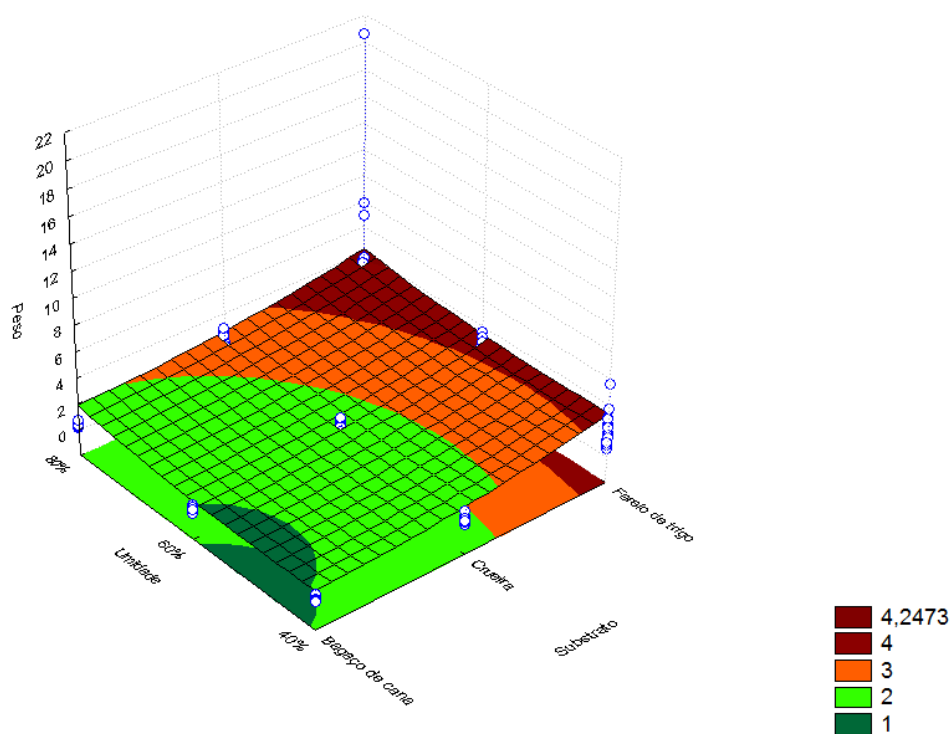


Figura 46. Produção de acordo com substrato e umidade.

Na Figura 46 verifica-se que os maiores valores de produção são obtidos utilizando farelo de trigo como substrato e 80% de umidade, considerando água

como umedecedor, óleo de fritura como indutor e 48h de fermentação. A Figura 47 mostra as médias de produção para essa configuração.

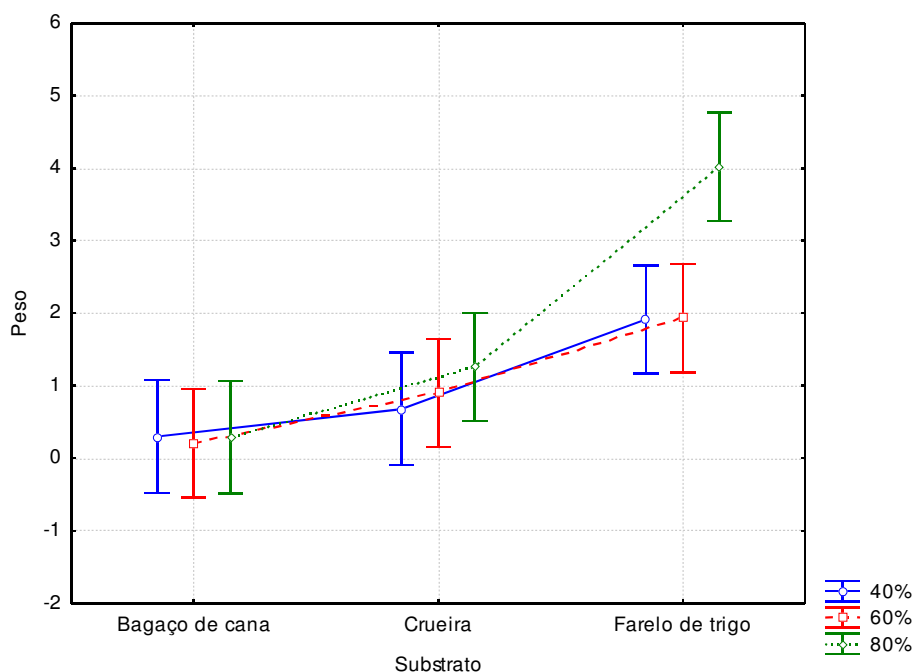


Figura 47. Médias de produção de acordo com substrato e umidade.

Com relação à produção, nota-se que as melhores variáveis encontradas possuíam uma umidade de 80%, o que pode sugerir que a umidade influenciou a produção do biossurfactante e, conseqüentemente, a tensão superficial. Em FES, o substrato deve estar devidamente umedecido a ponto de formar um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas do substrato devem haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor para permitir o crescimento e o metabolismo do micro-organismo. Quando isso não acontece, por possuírem teores reduzidos, pode causar um baixo crescimento bacteriano e influenciar negativamente na produção do biossurfactante.

A Figura 48 mostra o comportamento de produção de acordo com substrato e tempo de fermentação.

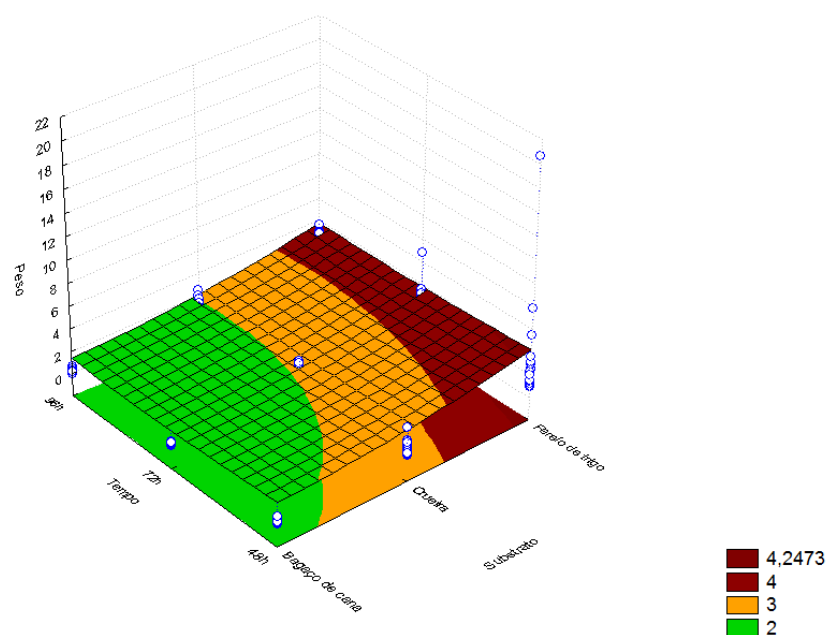


Figura 48. Produção de acordo com substrato e tempo de fermentação.

Os maiores valores de produção encontram-se no gráfico acima na região referente ao substrato farelo de trigo com tempo de fermentação de 48h, considerando água como umedecedor, óleo de fritura como indutor e 80% de umidade. Nesse caso é possível observar que o tempo não influenciou de forma significativa no peso, portanto, utilizou-se 48h de fermentação para otimizar o processo fermentativo, o que acarreta em uma grande vantagem econômica, pois proporciona uma economia no custo do processo.

A Figura 49 mostra as médias de produção em relação a essa condição.

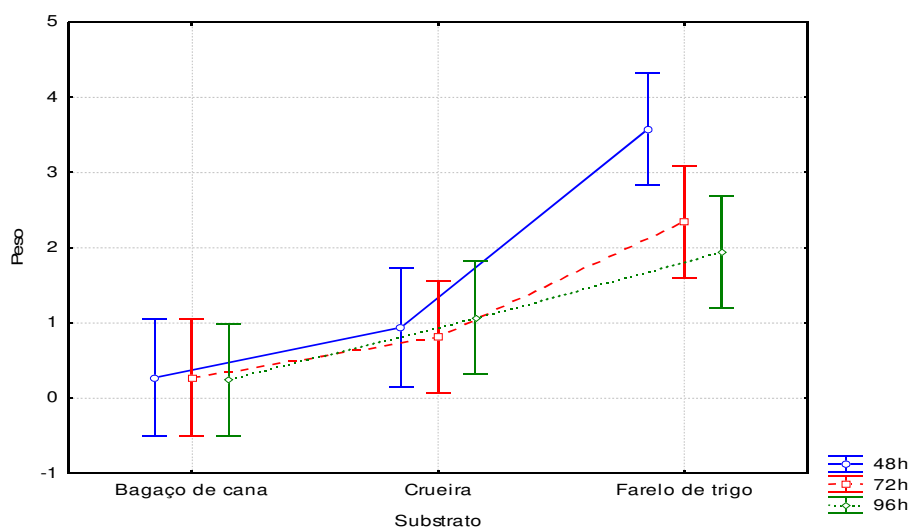


Figura 49. Médias de produção de acordo com substrato e tempo de fermentação.

É importante ressaltar a alta produção bruta obtida quando foi utilizada a farelo de trigo como substrato em 48 horas de fermentação, resultado esse que também pode ser visualizado no gráfico de superfície.

Outra coisa em comum dentre as médias das melhores variáveis obtidas, é que o tempo de fermentação variou entre 48 e 72 horas e pela diferença dos valores, pode indicar o tempo de fermentação em 48 horas.

A Figura 50 mostra a produção de acordo com umedecedor e tempo de fermentação.

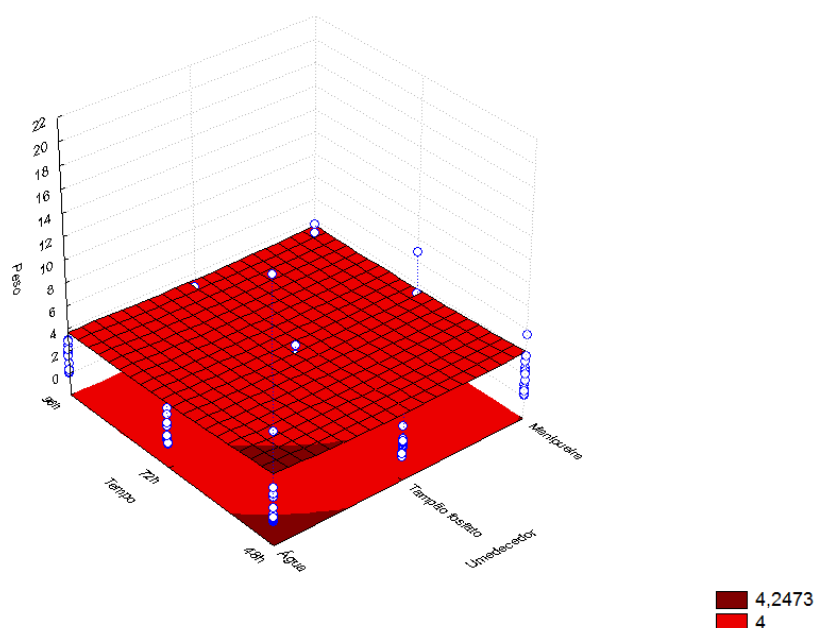


Figura 50. Produção de acordo com umedecedor e tempo de fermentação.

A melhor condição para se obter os maiores valores de produção é utilizando água como umedecedor e 48h de fermentação, considerando farelo de trigo como substrato, óleo de fritura como indutor e 80% de umidade. A Figura 51 mostra as médias de produção em relação a essa condição.

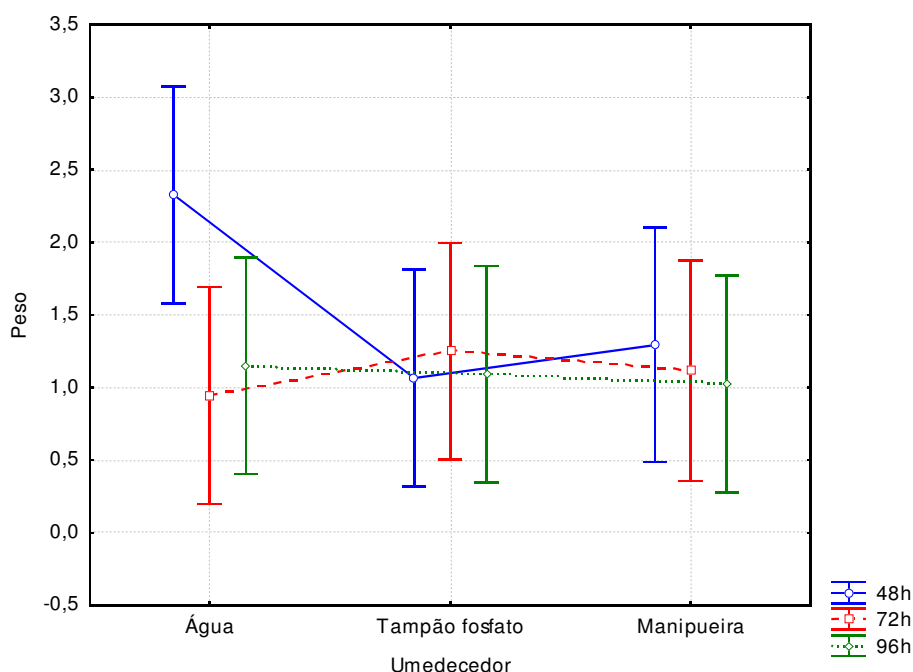


Figura 51. Médias de produção de acordo com umedecedor e tempo de fermentação.

A Figura 51 mostra que as maiores médias de produções de biossurfactante se concentram na região a qual a fermentação ocorreu com o substrato de farelo de trigo (maior fonte de nutrientes) e com água como umedecedor em 48 horas de fermentação, seguida da utilização de manipueira como umedecedor em 48 horas de fermentação. Portanto, pode-se utilizar como umedecedor água ou manipueira para se obter produções satisfatórias, ou seja, a utilização de um umedecedor que possui um custo menor, seja água ou um resíduo que também colabora no problema ambiental de descarte de resíduos e pode promover um bom resultado para a produção de biossurfactante, gerando uma economia no processo fermentativo.

A Figura 52 mostra o comportamento de produção de acordo com o indutor e a umidade.

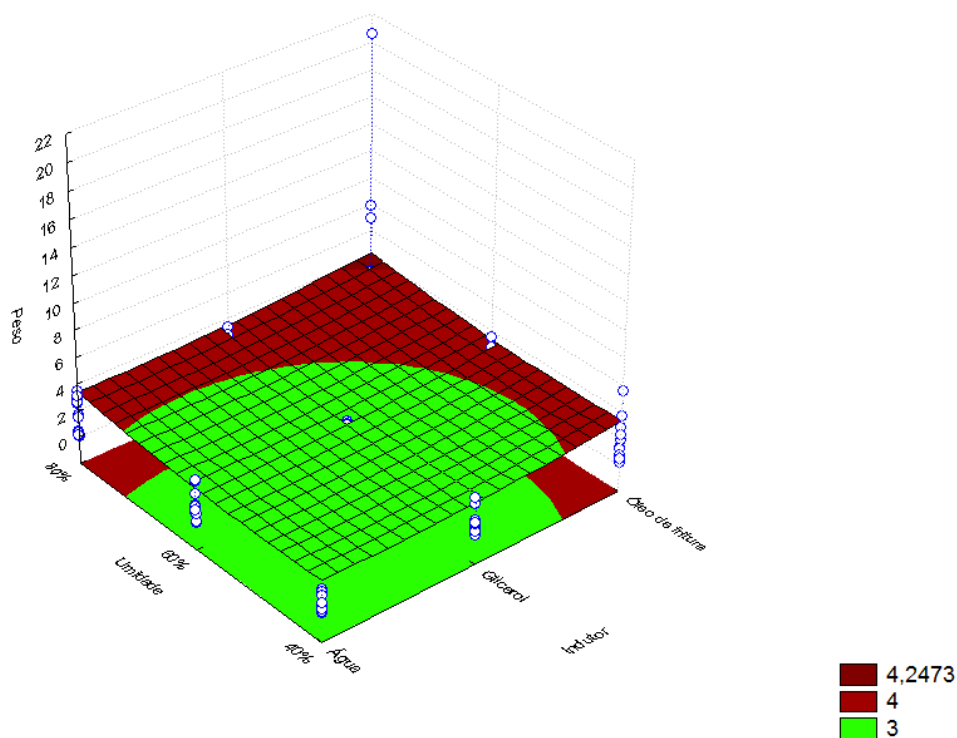


Figura 52. Produção de acordo com indutor e umidade.

A produção apresentou maiores valores utilizando óleo de fritura como indutor e 80% de umidade, considerando farelo de trigo como substrato, água como umedecedor e 48h de fermentação. A Figura 53 mostra as médias de produção nessa condição.

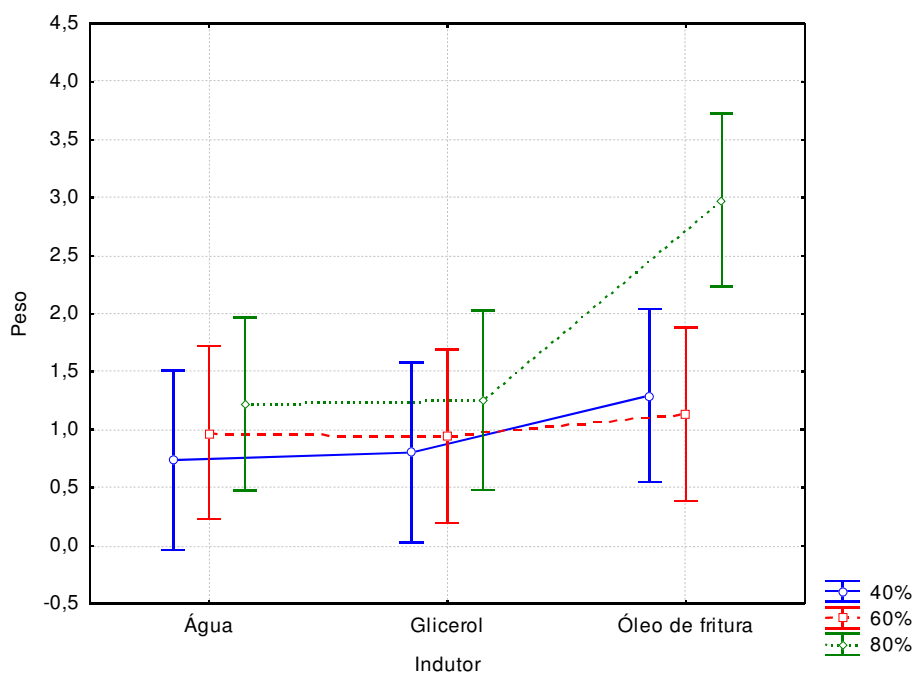


Figura 53. Médias de produção de acordo com indutor e umidade.

A Figura 54 mostra a produção de acordo com indutor e tempo de fermentação.

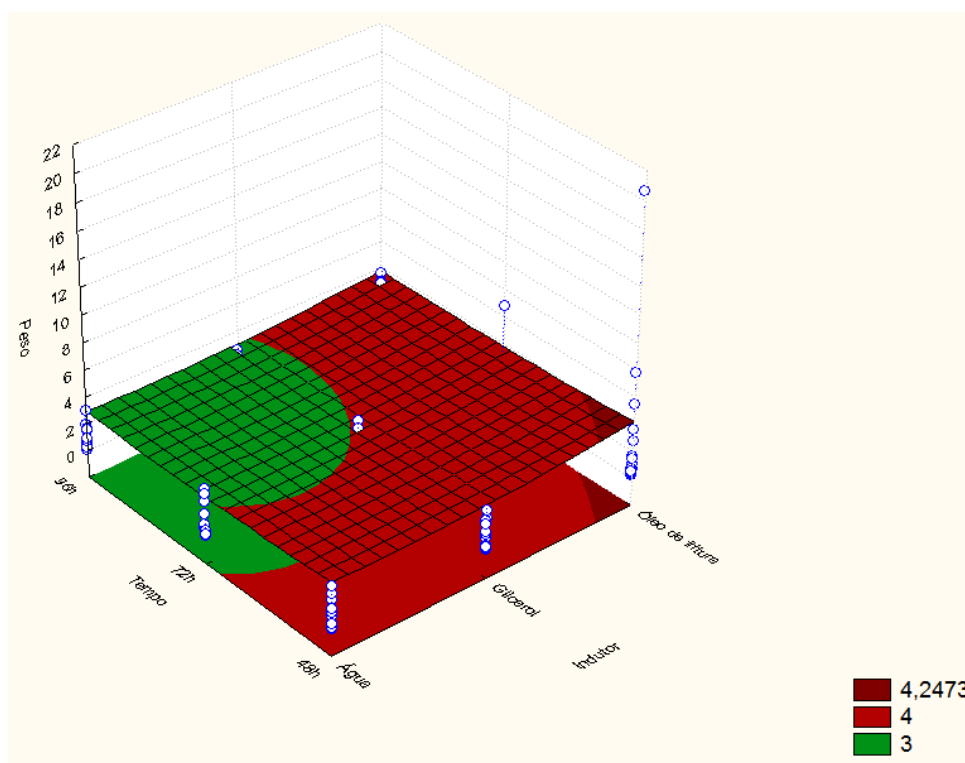


Figura 54. Produção de acordo com indutor e tempo de fermentação.

A produção se mostrou maior utilizando óleo de fritura como indutor com 48h de fermentação, considerando água como umedecedor, farelo de trigo como substrato e 80% de umidade. A Figura 55 mostra as médias de produção nas condições mencionadas.

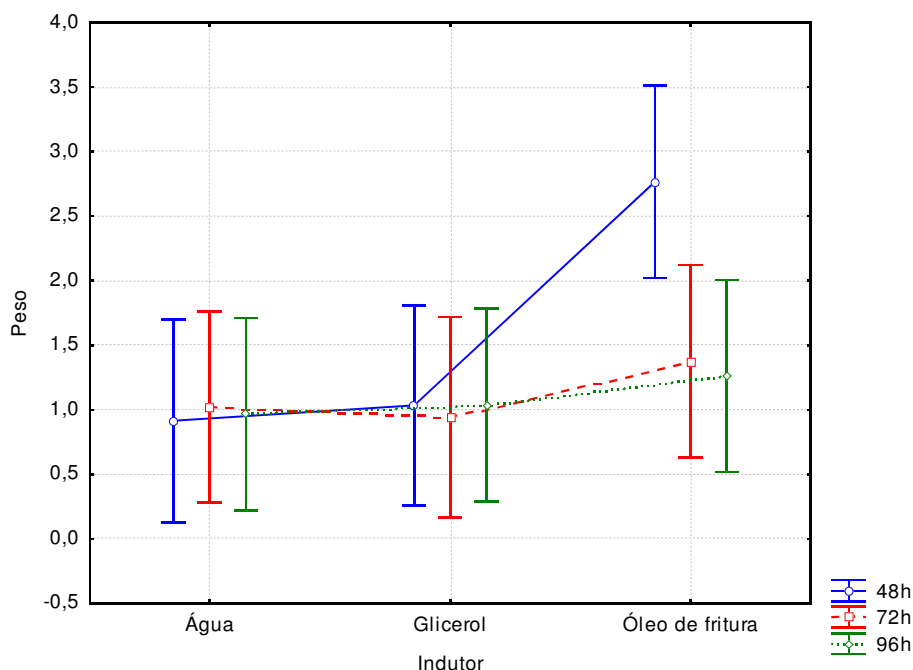


Figura 55. Médias de produção de acordo com indutor e tempo de fermentação.

Verifica-se (Figura 55) que maiores médias de produção bruta de biossurfactante estão ligados á utilização de óleo de fritura como indutor nos 3 períodos de fermentação, porém o melhor resultado foi encontrado em 48 horas de fermentação.

Os resultados encontrados neste trabalho são próximos aos encontrados por Barros (2007) que, estudando a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* por fermentação em estado submerso e utilizando manípueira como substrato em 36 horas de fermentação produziu em torno de 8 g/L. Porém, após as 48 horas de fermentação a produção dele caiu para menos de 5 g/L.

Costa (2005) estudando a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* por fermentação em estado submerso e em estado sólido e utilizando manípueira como substrato obteve como maior produção de biossurfactante o valor de 2,5 g/L em 36 horas de fermentação valor esse que decaiu para menos de 2 g/L após as 48 horas.

6.2.3 Índice de emulsificação

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

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 15 apresentaram valores de índice de emulsificação que mantiveram pelo menos 50% da emulsão original, e dentre essas, 3 variáveis mantiveram o valor de índice de emulsificação maior que 60% após as 24 horas da sua formação.

A melhor variável encontrada foi: trigo + tampão fosfato + água + 80% de umidade em 96 horas de fermentação que obteve uma média de 65% da emulsão original mantida após 24 horas.

A Tabela 9 mostra os resultados do modelo quadrático com interação entre os fatores para o índice de emulsificação, sendo esse modelo o que apresentou o maior ajuste: $R^2=0,80266$.

Tabela 9. Resultados da ANOVA fatorial para o índice de emulsificação.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L+Q)	175,80	<0,001
Umedecedor (L+Q)	1,01	0,364
Indutor (L+Q)	2,01	0,136
Umidade (L+Q)	2,39	0,095
Tempo (L+Q)	1,47	0,234
Substrato*Umedecedor	1,73	0,147
Substrato*Indutor	3,07	0,019
Substrato*Umidade	3,43	0,010
Substrato*Tempo	1,85	0,123
Umedecedor*Indutor	3,15	0,017
Umedecedor*Umidade	0,93	0,449
Umedecedor*Tempo	2,31	0,061
Indutor*Umidade	1,29	0,277
Indutor*Tempo	0,51	0,723
Umidade*Tempo	2,36	0,057

Observa-se a existência de efeitos quadráticos significativos do substrato para o índice de emulsificação, mostrando significativas interações do substrato com o indutor e com a umidade e do umedecedor com o indutor. Os parâmetros que otimizaram os valores do índice de emulsificação foram: farelo de trigo como substrato, tampão fosfato como umedecedor e água como indutor. Como não houve efeitos significativos para umidade e tempo de fermentação, foram escolhidos os menores valores empregados, ou seja, 40% e 48 h, respectivamente.

Entre todas as melhores variáveis encontradas, um fator em comum: nenhuma das variáveis que obtiveram valores acima de 60% tinha o glicerol como indutor na sua fermentação. Nas variáveis em que foi utilizado o glicerol como indutor, somente uma variável conseguiu manter 50% da sua formação original, demonstrando que este indutor pode ser prejudicial para uma produção e/ou manutenção da estabilidade no índice de emulsificação.

A Figura 56 mostra o comportamento do índice de emulsificação de acordo com o substrato e o indutor.

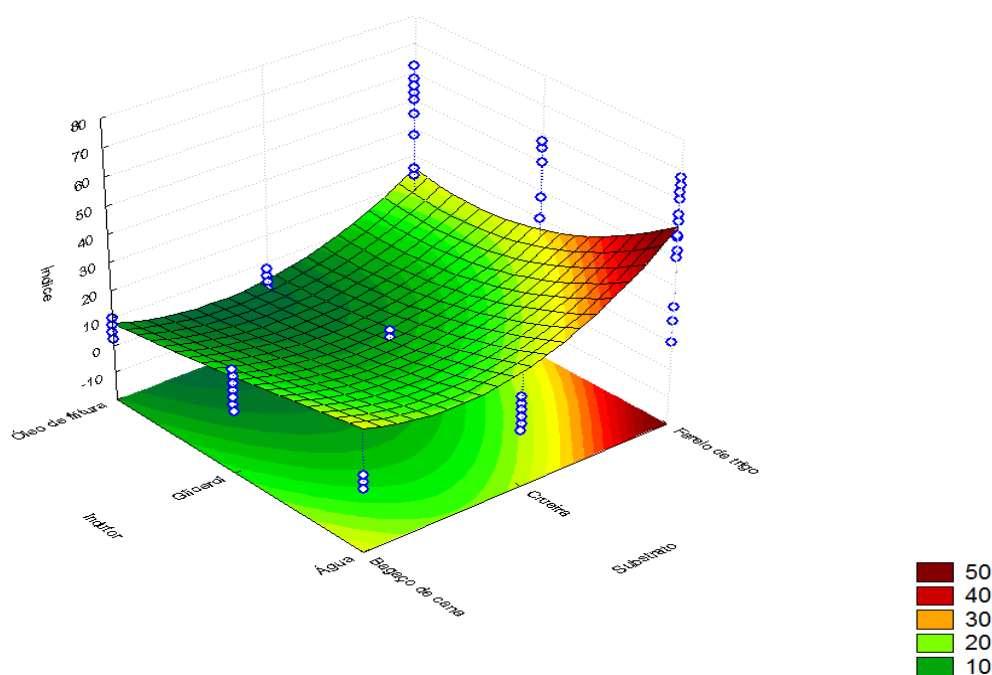


Figura 56. Índice de emulsificação de acordo com substrato e indutor.

Os resultados mostram que o índice de emulsificação é maior quando se utiliza o farelo de trigo como substrato e a água sem a presença de indutor, considerando tampão fosfato como umedecedor, 40% de umidade e 48h de

fermentação. A Figura 57 mostra as médias do índice de emulsificação de acordo com o substrato e o indutor.

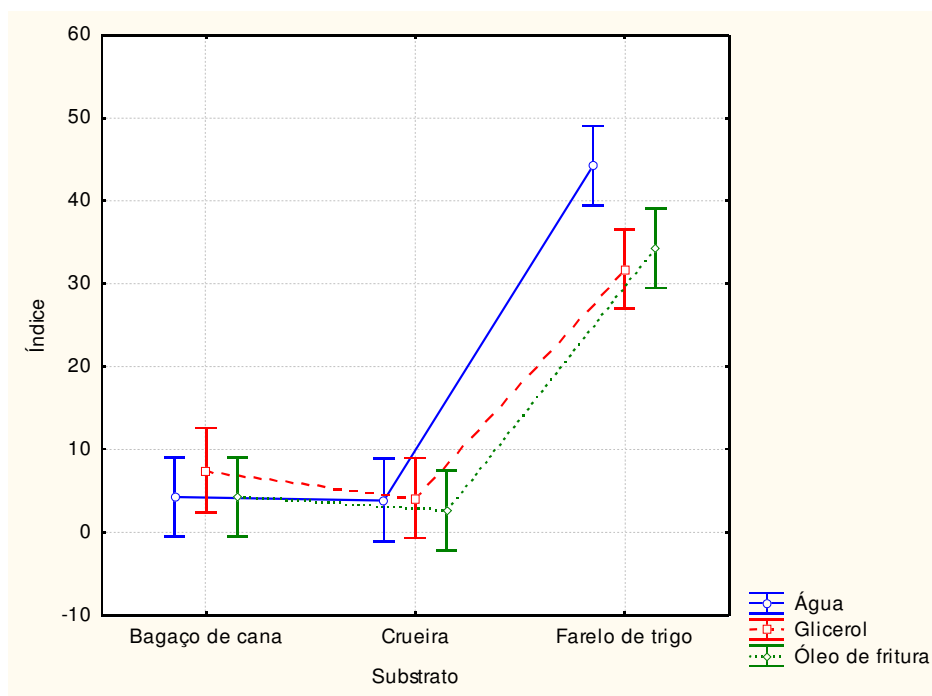


Figura 57. Médias do índice de emulsificação de acordo com substrato e indutor.

O gráfico das médias (Figura 57) mostra que os maiores índices de emulsificação são obtidos utilizando o farelo de trigo como substrato (maior fonte de nutrientes), porém, o indutor a ser utilizado pode ser água ou óleo de fritura como indutor ou água, sendo que esta apresentou maiores índices de emulsificação em comparação com o óleo de fritura.

Além disso, esses resultados foram possíveis de serem verificados considerando tampão fosfato como umedecedor, 40% de umidade e 48 horas de tempo de fermentação.

Para os substratos crueira e bagaço de cana nenhuma das 27 variáveis que cada substrato possui conseguiu manter o índice de emulsificação no valor de 50% da sua formação original, o que indica que o substrato tem uma grande influência quanto à produção e manutenção das emulsões produzidas pelos biossurfactantes.

A melhor variável encontrada quando utilizado a crueira como substrato foi: crueira + manipueira + glicerol + 60% de umidade em 48 horas de fermentação, onde o índice de emulsificação manteve apenas 8,5% da sua formação original.

Quando utilizado o substrato sólido bagaço de cana a melhor variável foi: bagaço de cana + tampão fosfato + glicerol + 40% de umidade em 72 horas de

fermentação, que manteve 15% da sua formação original após 24 horas. Exceto essa variável, as demais obtiveram valores de manutenção abaixo de 10%.

A Figura 58 mostra o comportamento do índice de emulsificação de acordo com o substrato e o umedecedor.

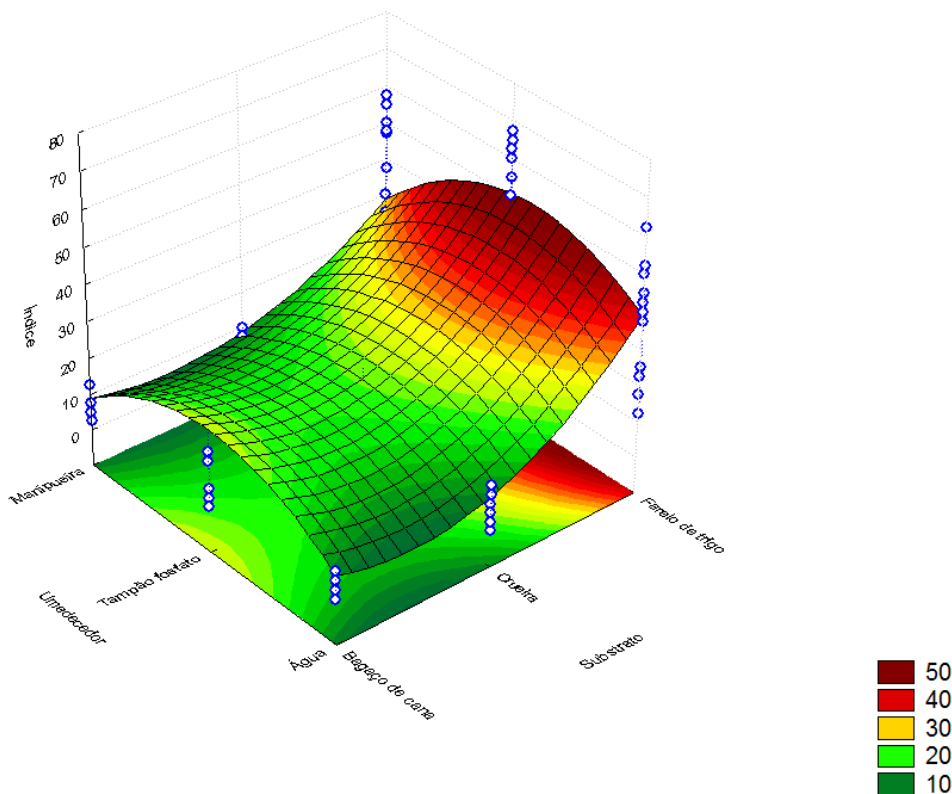


Figura 58. Índice de emulsificação de acordo com substrato e umedecedor.

Os resultados mostram que o índice de emulsificação é maior quando se utiliza o farelo de trigo como substrato e o tampão fosfato como umedecedor, considerando água como indutor, 40% de umidade e 48h de fermentação. A Figura 59 mostra as médias do índice de emulsificação de acordo com o substrato e o umedecedor.

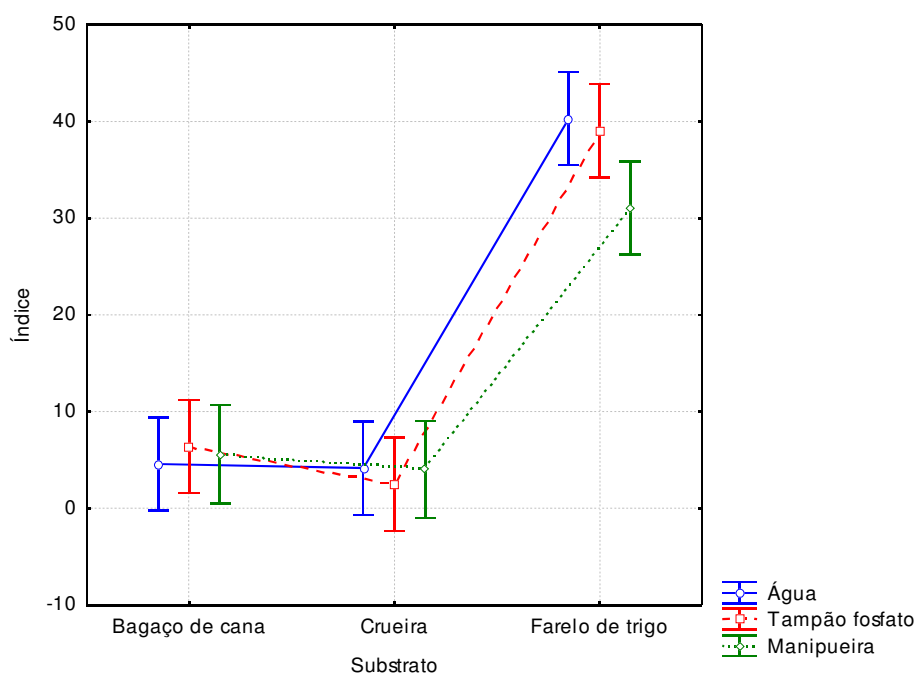


Figura 59. Médias do índice de emulsificação de acordo com substrato e umedecedor.

Nota-se que os valores médios do índice de emulsificação quando se utiliza farelo de trigo como substrato e água e tampão fosfato como umedecedores são aproximados. No entanto, avaliando o gráfico da Figura 59 é possível verificar certa tendência de aumento do índice de emulsificação utilizando o tampão fosfato como umedecedor em detrimento da água.

A Figura 60 mostra o comportamento do índice de emulsificação de acordo com o umedecedor e o indutor.

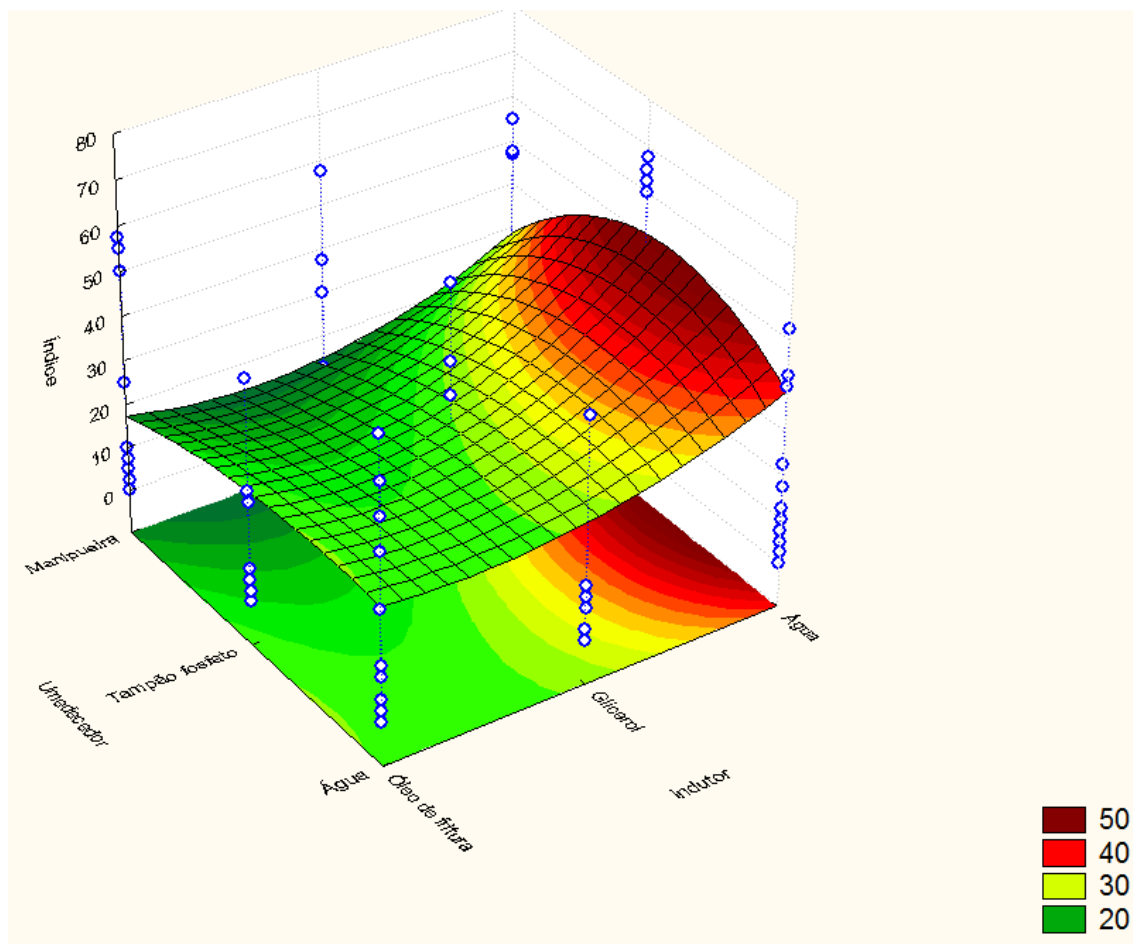


Figura 60. Índice de emulsificação de acordo com umedecedor e indutor.

Os resultados mostram que o índice de emulsificação é maior quando se utiliza tampão fosfato como umedecedor e água na ausência de indutor, considerando farelo de trigo como substrato, 40% de umidade e 48h de fermentação. A Figura 61 mostra as médias do índice de emulsificação de acordo com o umedecedor e o indutor.

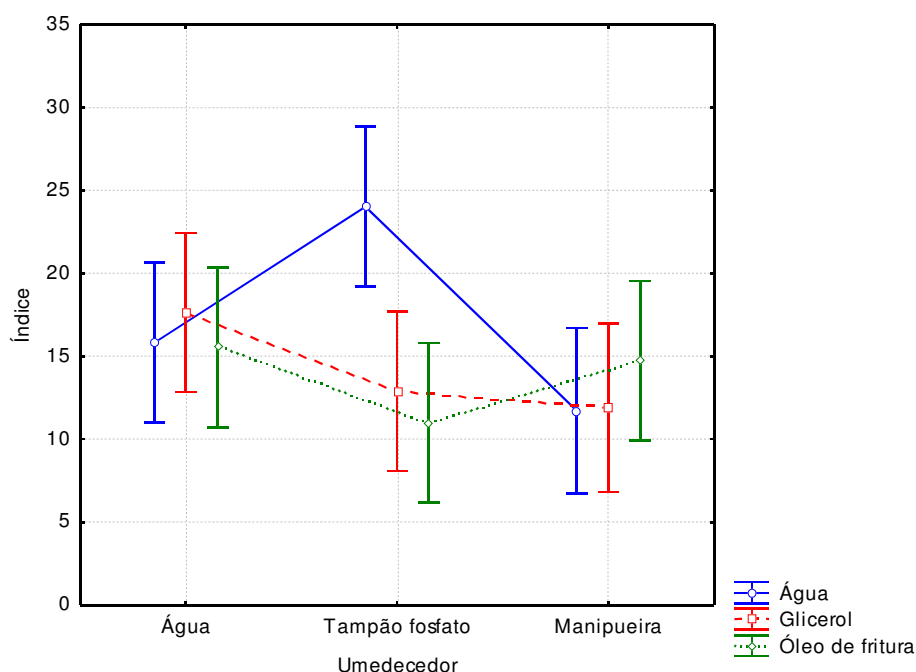


Figura 61. Médias do índice de emulsificação de acordo com umedecedor e indutor.

O gráfico de médias (Figura 61) reitera os resultados da superfície, ou seja, os maiores índices de emulsificação são verificados quando o farelo de trigo foi utilizado como substrato, tampão fosfato como umedecedor e a água na ausência de indutor. Esse resultado pode pressupor que o índice de emulsificação é uma variável dependente que não está relacionada à fonte de carbono disponível no meio, já que essa característica está ligada ao indutor que neste caso é água (sem indução). Adicionalmente, o índice de emulsificação apresentou menor variação nos dados quando o farelo de trigo foi utilizado juntamente com a água, na ausência de um indutor.

Outra característica em comum dentre as melhores variáveis obtidas foi que em sua quase totalidade todas as variáveis possuíam as umidades de 60 ou 80%.

6.2.4 Atividade Emulsificante

A Tabela 10 mostra os resultados do modelo quadrático com interação entre os fatores para atividade emulsificante, sendo esse modelo o que apresentou o maior ajuste: $R^2 = 0,6744$.

Tabela 10. Resultados da ANOVA fatorial para a atividade emulsificante.

Variáveis	F	Valor P
Substrato (L+Q)	4,72	0,010
Umedecedor (L+Q)	5,39	0,005
Indutor (L+Q)	7,69	<0,001
Umidade (L+Q)	6,21	0,002
Tempo (L+Q)	0,26	0,764
Substrato*Umedecedor	13,53	<0,001
Substrato*Indutor	4,97	0,001
Substrato*Umidade	2,82	0,028
Substrato*Tempo	2,56	0,042
Umedecedor*Indutor	2,01	0,097
Umedecedor*Umidade	3,78	0,006
Umedecedor*Tempo	6,01	<0,001
Indutor*Umidade	3,18	0,016
Indutor*Tempo	2,32	0,061
Umidade*Tempo	2,99	0,021

Inúmeros efeitos interativos foram observados para a atividade emulsificante. Os parâmetros que otimizaram os valores do atividade emulsificante para a maioria das interações foram: farelo de trigo como substrato, tampão fosfato como umedecedor e óleo de fritura como indutor. Para a umidade, a atividade emulsificante apresentou maiores valores com 80% e 48h de fermentação, visto que o tempo não apresentou efeito significativo.

É interessante ressaltar que a interação substrato*indutor apresentou duas formas interessantes de se obter valores altos para a atividade. Em ambas as formas aplicou-se óleo de fritura como indutor, 80% de umidade e 48h de fermentação; no entanto, a primeira forma mostrou valores altos de atividade emulsificante utilizando crueira como substrato e tampão fosfato como umedecedor e a segunda forma farelo de trigo como substrato e manipueira como umedecedor. As Figuras 62 e 63 mostram o comportamento da atividade emulsificante da primeira e da segunda configuração, respectivamente.

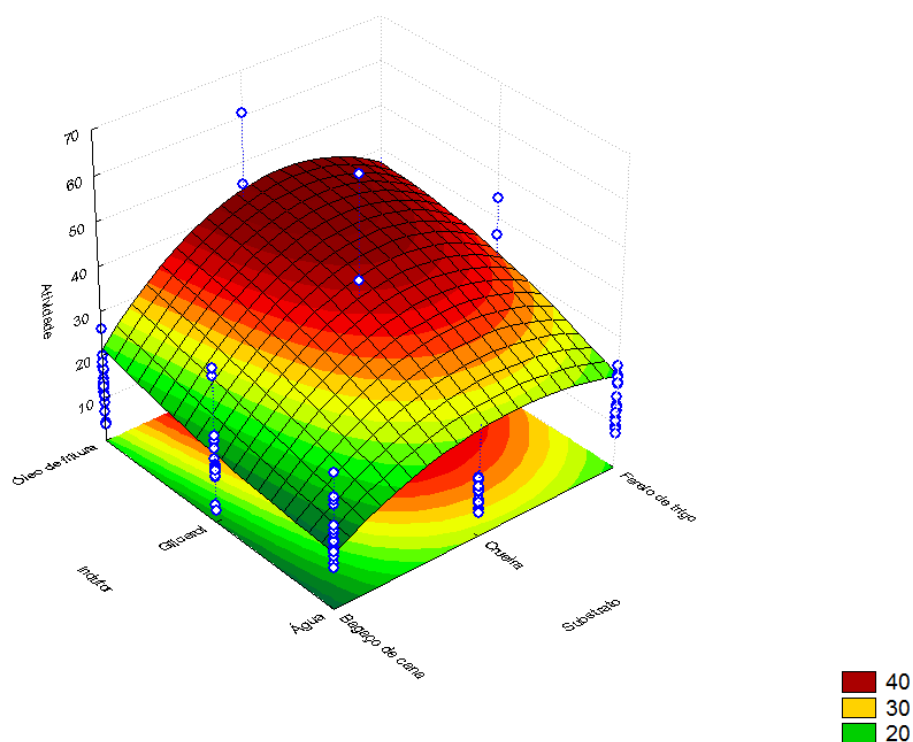


Figura 62. Atividade emulsificante em relação ao substrato e indutor, sendo tampão fosfato como umedecedor, 80% de umidade e 48h de fermentação.

Nota-se que para essas condições, o melhor substrato a ser utilizado seria a crueira com o óleo de fritura como indutor.

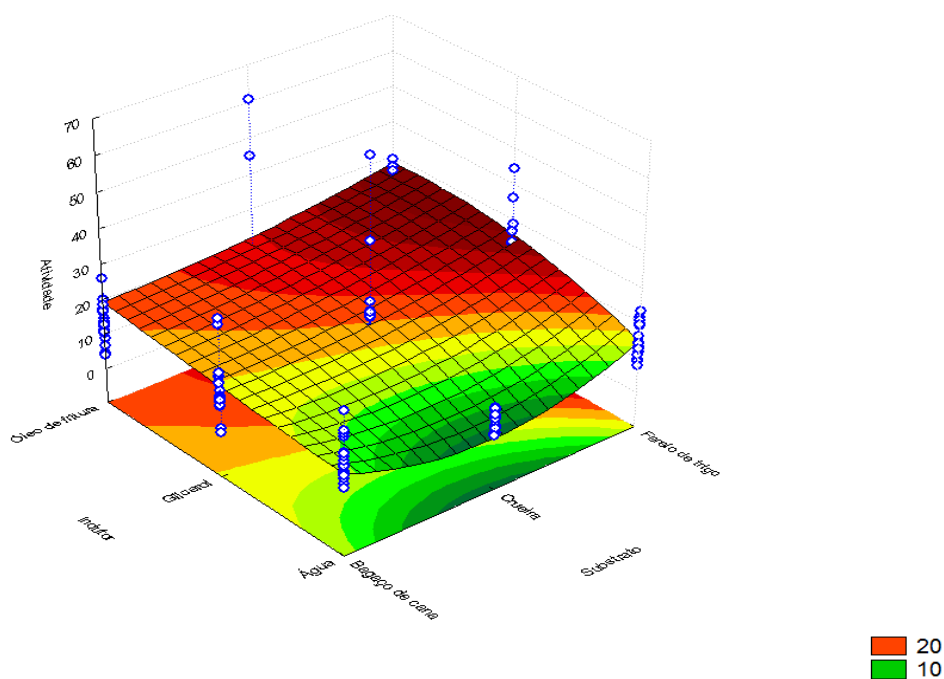


Figura 63. Atividade emulsificante em relação ao substrato e indutor, sendo manipueira como umedecedor, 80% de umidade e 48h de fermentação.

Nessas condições, os maiores valores de atividade estão vinculados ao uso do farelo de trigo como substrato e óleo de fritura como indutor.

Das 27 variáveis estudadas usando farelo de trigo como substrato, 11 apresentaram valores acima de 20 UE g⁻¹, sendo que as variáveis que obtiveram os maiores valores foram: trigo + manipueira + glicerol + 80% de umidade em 48 horas de fermentação com 40,3 UE g⁻¹ e trigo + manipueira + glicerol + 60% de umidade em 72 horas com 25,9 UE g⁻¹. Essas melhores variáveis possuem um fator em comum: a utilização do glicerol como solução indutora. Nessa análise, ocorreu o inverso do que vinha ocorrendo nas outras citadas anteriormente: o substrato farelo de trigo não obteve o melhor valor de atividade emulsificante, porém foi o substrato que mais produziu valores altos de atividade emulsificantes.

Pinto; Martins; Costa (2009) estudando a cinética de produção de biossurfactante bacteriano e utilizando *Bacillus subtilis* em fermentação em estado submerso obteve o valor de 23 UE g⁻¹, ou seja, valores inferiores ao encontrado neste trabalho.

A Figura 64 mostra o comportamento da atividade emulsificante em relação ao substrato e ao umedecedor, considerando óleo de fritura como indutor, 80% de umidade e 48h de fermentação.

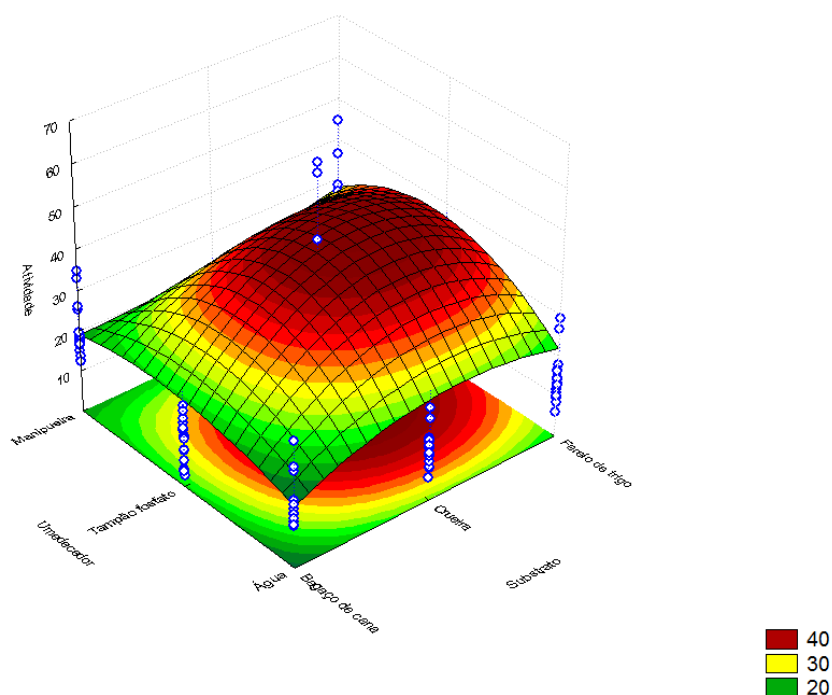


Figura 64. Atividade emulsificante em relação ao substrato e umedecedor.

Verifica-se que, nesse caso, os maiores valores de atividade se encontram utilizando tampão fosfato como umedecedor e o substrato com fonte de carbono entre crueira e farelo de trigo, sendo possível utilizar os dois como substrato para otimizar os valores de atividade emulsificante. A Figura 65 mostra as médias da atividade nessas condições experimentais.

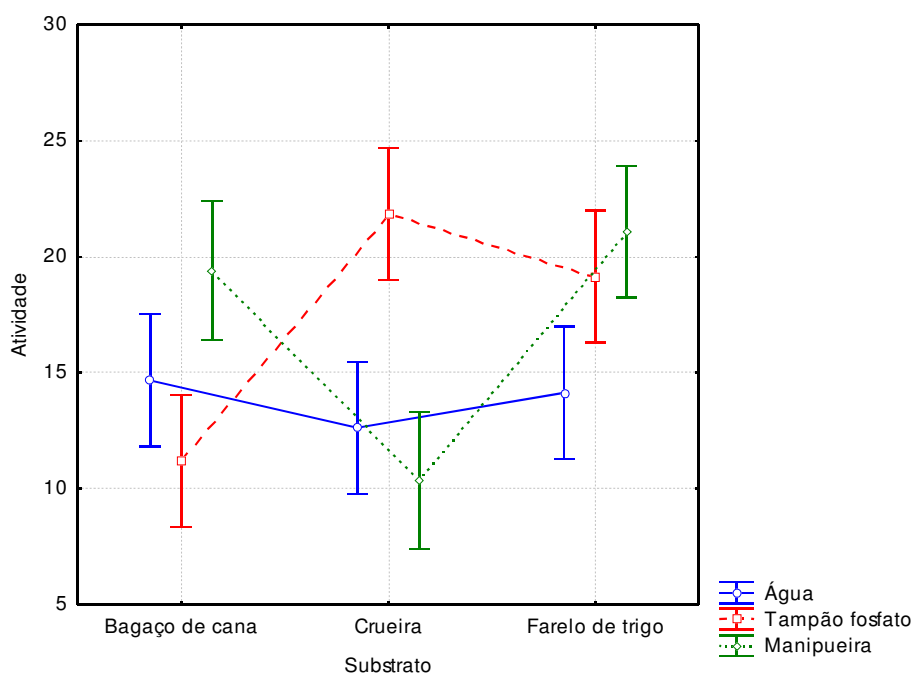


Figura 65. Médias da atividade emulsificante em relação ao substrato e umedecedor.

Avaliando as médias de forma pontual, nota-se que os maiores valores de atividade estão vinculados ao uso da crueira como substrato e tampão fosfato como umedecedor.

Os melhores resultados de atividade emulsificante foram encontrados quando foi utilizado o substrato crueira, com algumas variáveis com valores bem acima do que os encontrados com o farelo de trigo. Porém, é necessário ressaltar que das 27 variáveis analisadas, somente 3 obtiveram valores acima de 20 UE g⁻¹, enquanto que o farelo de trigo teve 11 variáveis com valor acima de 20 UE g⁻¹. As duas melhores variáveis: crueira + tampão fosfato + óleo + 80% em 96 horas e crueira + tampão fosfato + glicerol + 80% + 48 horas tiveram uma atividade emulsificante 52,8 UE g⁻¹ e 51,4 UE g⁻¹ respectivamente.

O bagaço de cana também apresentou 3 valores acima de 20 UE g⁻¹, sendo a variável: bagaço + manipueira + glicerol + 60% de umidade e 96 horas de

fermentação que obteve valores de 34 UE g^{-1} , ficando a grande maioria com valores abaixo de 10 UE g^{-1} .

A Figura 66 mostra os valores de atividade emulsificante de acordo com substrato e umidade.

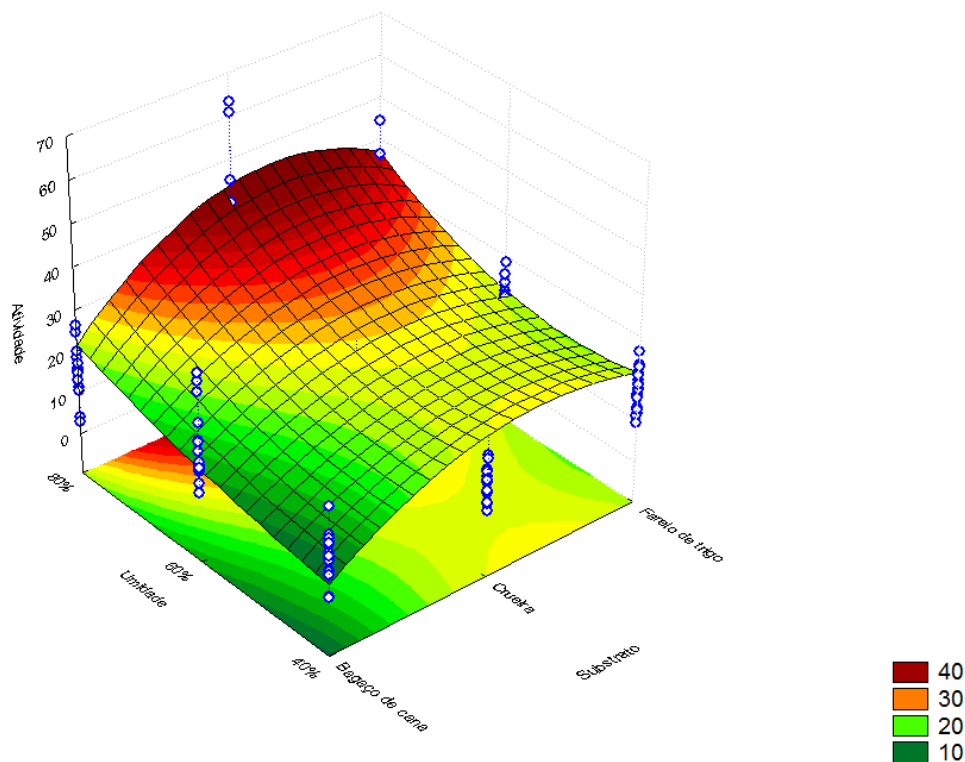


Figura 66. Atividade emulsificante de acordo com substrato e umidade.

Nota-se que os valores de atividade emulsificante são maiores utilizando 80% de umidade e crueira ou farelo de trigo como substrato, utilizando tampão fosfato como umedecedor, óleo de fritura como indutor e 48h de fermentação. O comportamento do gráfico mostra que os valores de atividade emulsificante poderiam ser superiores aos obtidos caso fosse utilizado percentuais superiores a 80% de umidade. A Figura 67 mostra as médias da atividade em relação ao substrato e à umidade. Nota-se que os valores reiteram os resultados obtidos pela análise da superfície.

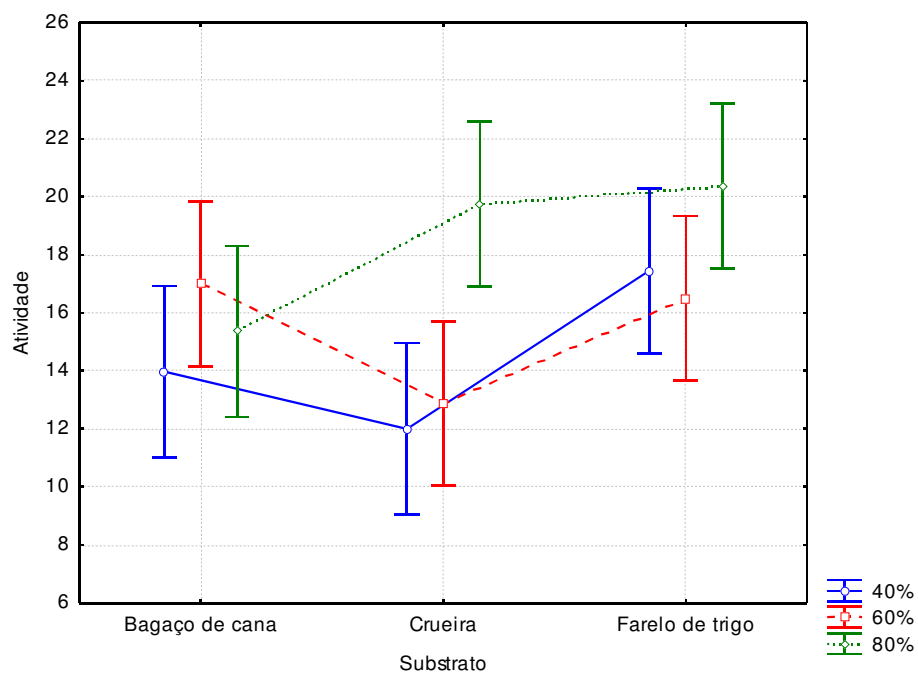


Figura 67. Atividade emulsificante em relação ao substrato e umidade.

A Figura 68 mostra os valores de atividade de acordo com o substrato e o tempo.

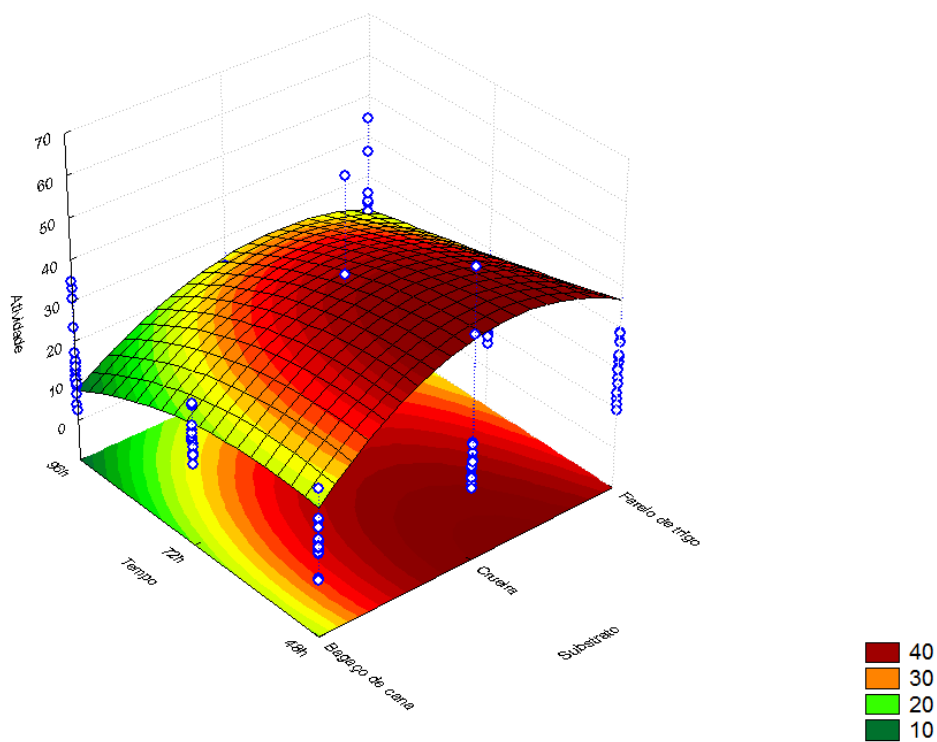


Figura 68. Atividade de acordo com substrato e tempo de fermentação.

A superfície evidencia melhores resultados de atividade para crueira ou farelo de trigo para substrato e 48h de tempo de fermentação, considerando tampão fosfato como umedecedor, óleo de fritura como indutor e 80% de umidade. A Figura 69 mostra as médias da atividade nessas condições.

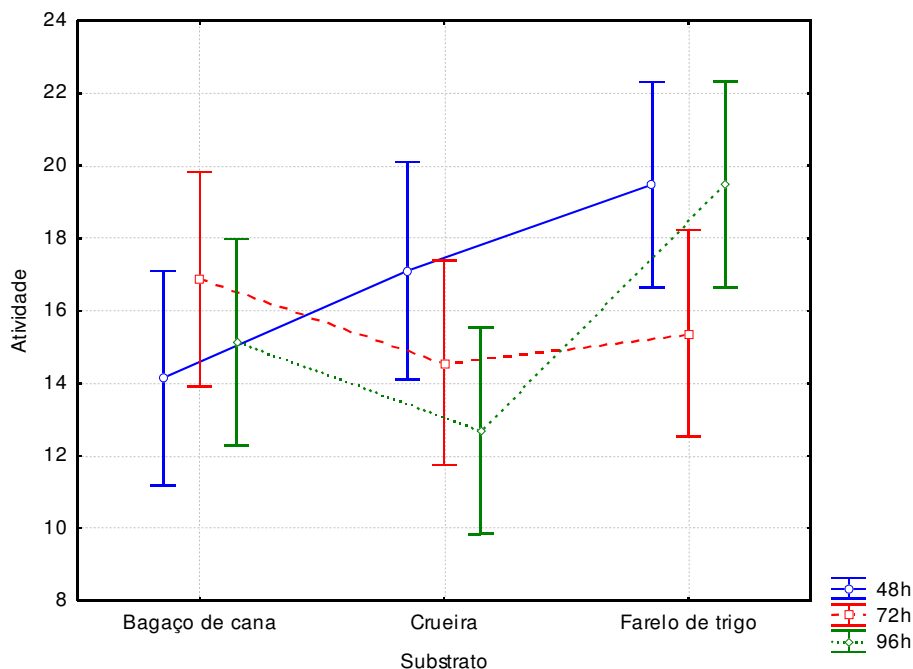


Figura 69. Médias da atividade emulsificante de acordo com substrato e tempo de fermentação.

Os resultados mostram valores altos de atividade utilizando farelo de trigo como substrato e 48h de tempo de fermentação.

A Figura 70 mostra o comportamento da atividade de acordo com o umedecedor e a umidade empregada no estudo.

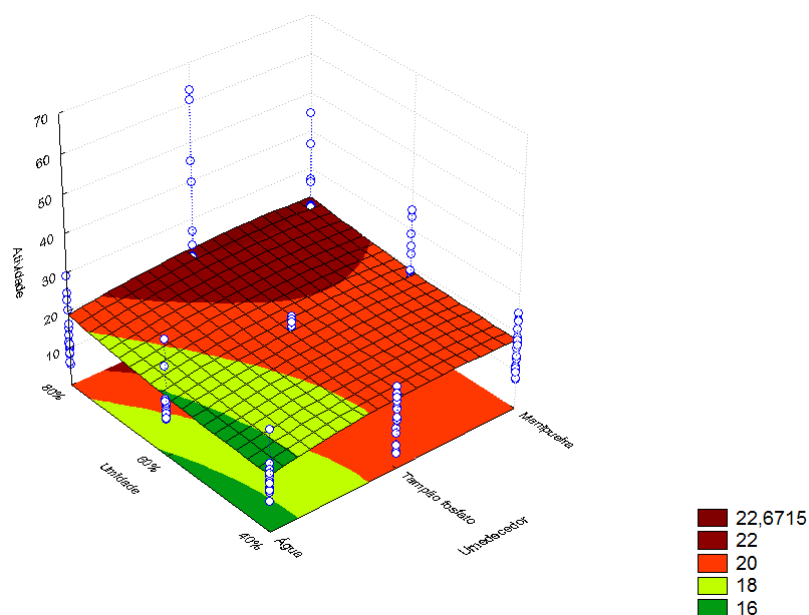


Figura 70. Atividade emulsificante de acordo com umedecedor e umidade.

Os maiores valores de atividade emulsificante podem ser observados utilizando tampão fosfato como umedecedor e umidade a 80%, considerando farelo de trigo como substrato, óleo de fritura como indutor e tempo de 48h de fermentação. A Figura 71 mostra as médias da atividade de acordo com os parâmetros citados anteriormente.

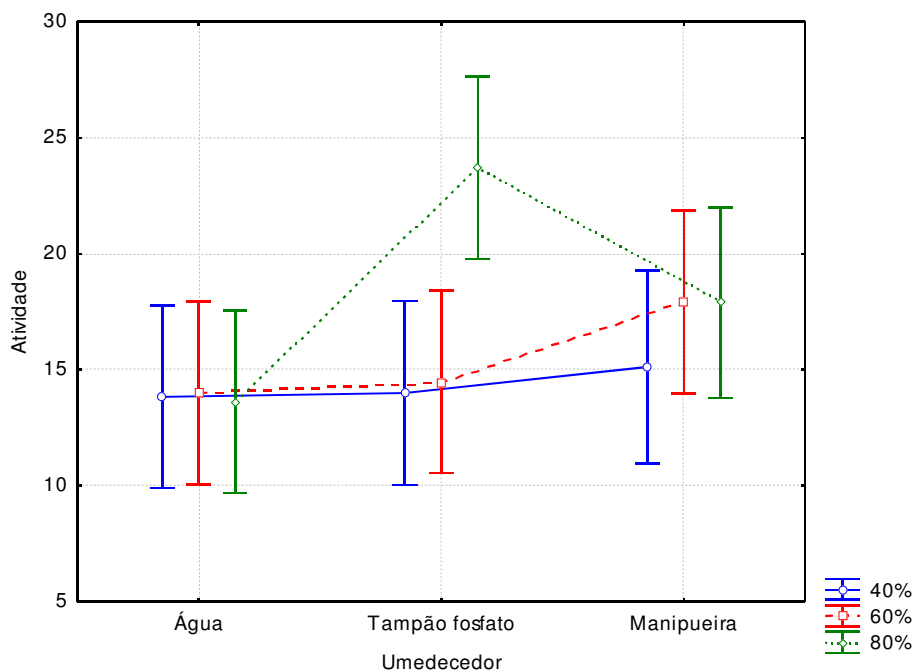


Figura 71. Médias da atividade emulsificante de acordo com umedecedor e umidade.

Os resultados reiteram que os maiores valores de atividade emulsificante são encontrados utilizando tampão fosfato e umidade a 80%.

A Figura 72 mostra o comportamento da atividade de acordo com o umedecedor e o tempo.

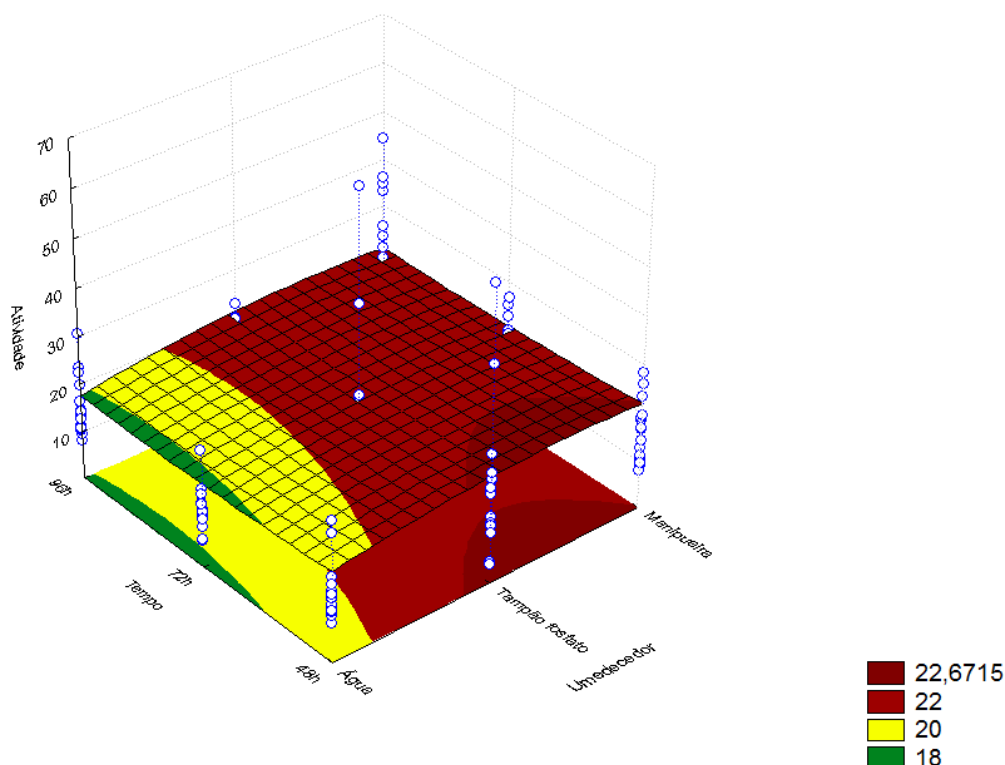


Figura 72. Atividade emulsificante de acordo com umedecedor e tempo de fermentação.

Nota-se que os maiores valores de atividade emulsificante são observados utilizando tampão fosfato como umedecedor e 48h de fermentação, considerando farelo de trigo como substrato, óleo de fritura como indutor e 80% de umidade. A Figura 73 mostra as médias da atividade para essa condição.

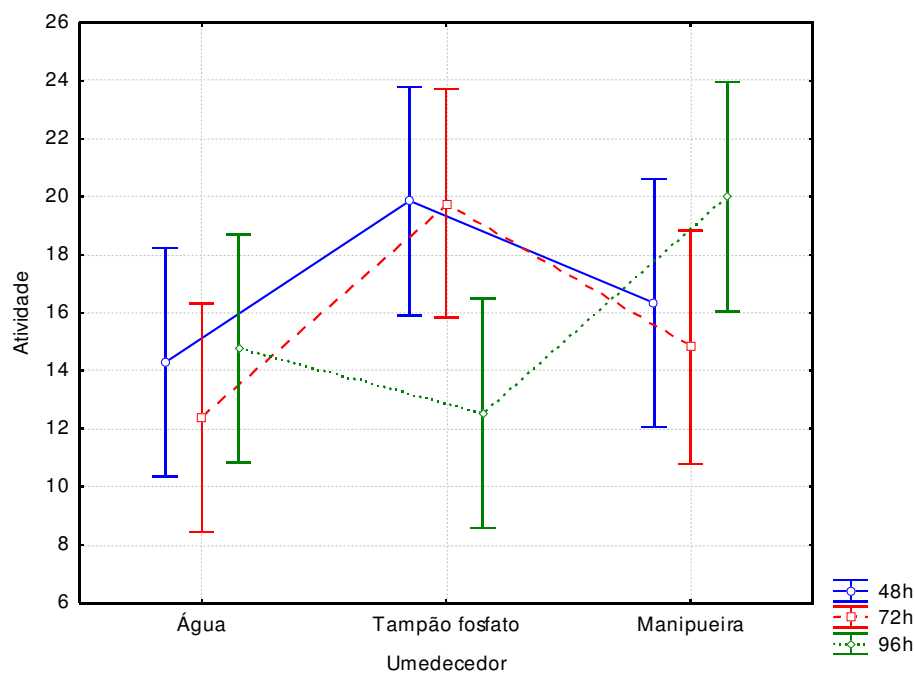


Figura 73. Médias da atividade emulsificante em relação ao umedecedor e tempo de fermentação.

A Figura 74 mostra os valores de atividade de acordo com o indutor e a umidade.

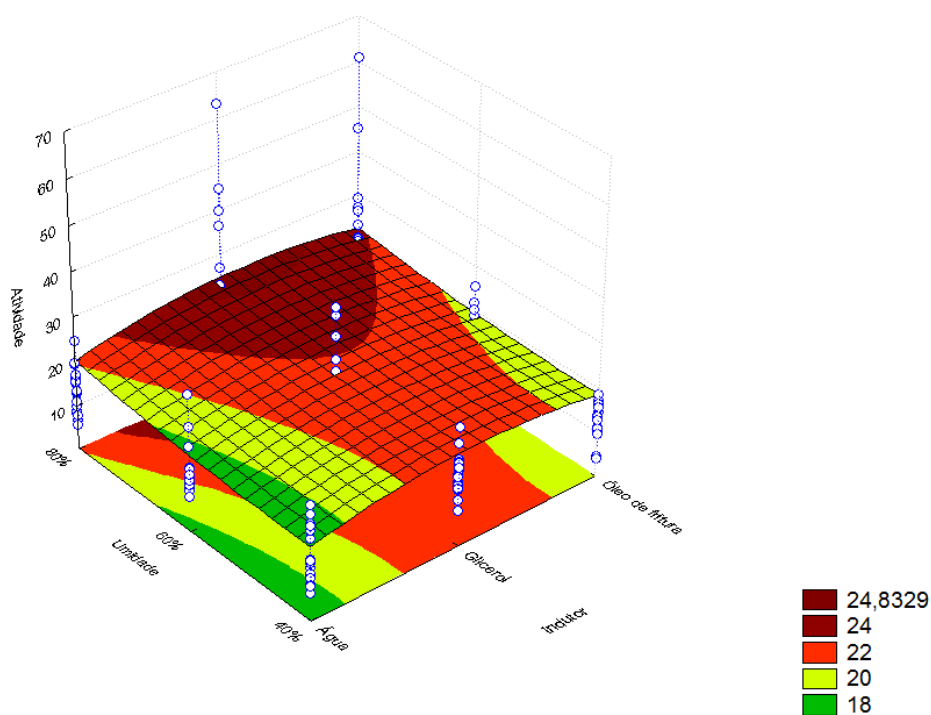


Figura 74. Atividade emulsificante de acordo com indutor e umidade.

Os resultados mostram a eficiência na aplicação do glicerol e do óleo de fritura como indutores juntamente com 80% de umidade, considerando farelo de trigo como substrato, tampão fosfato como umedecedor e 48h de fermentação. A Figura 75 mostra as médias da atividade em relação a esses parâmetros.

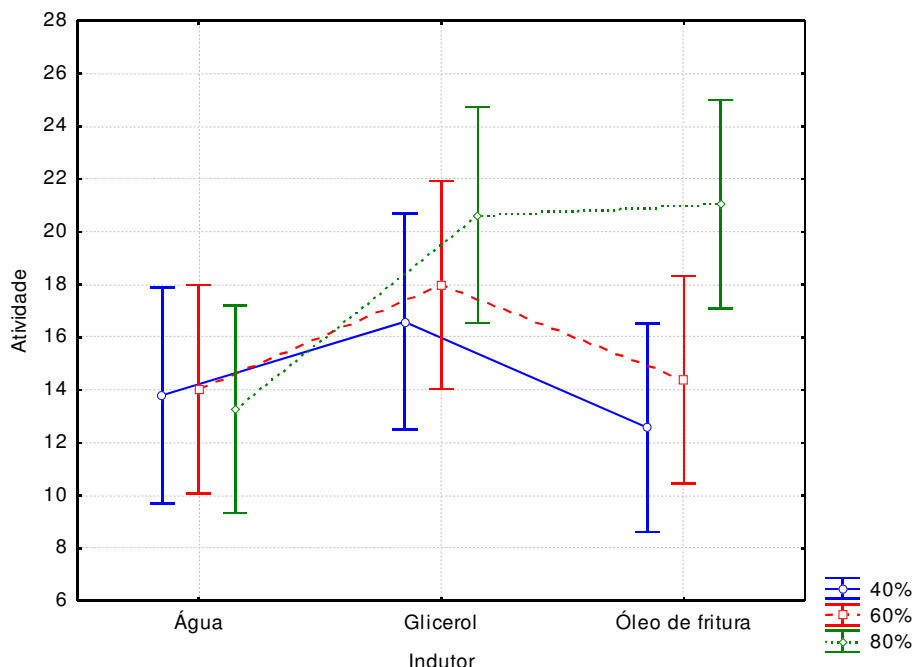


Figura 75. Médias da atividade emulsificante de acordo com indutor e umidade.

Esses resultados (Figura 75) foram superiores aos encontrados por Martins; Kalil; Costa, (2008) que produziram biossurfactante a partir de *Aspergillus fumigatus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo e casca de arroz e obtiveram valores máximos de 11,54 UE g⁻¹.

A Figura 76 mostra o comportamento da atividade de acordo com umidade e tempo.

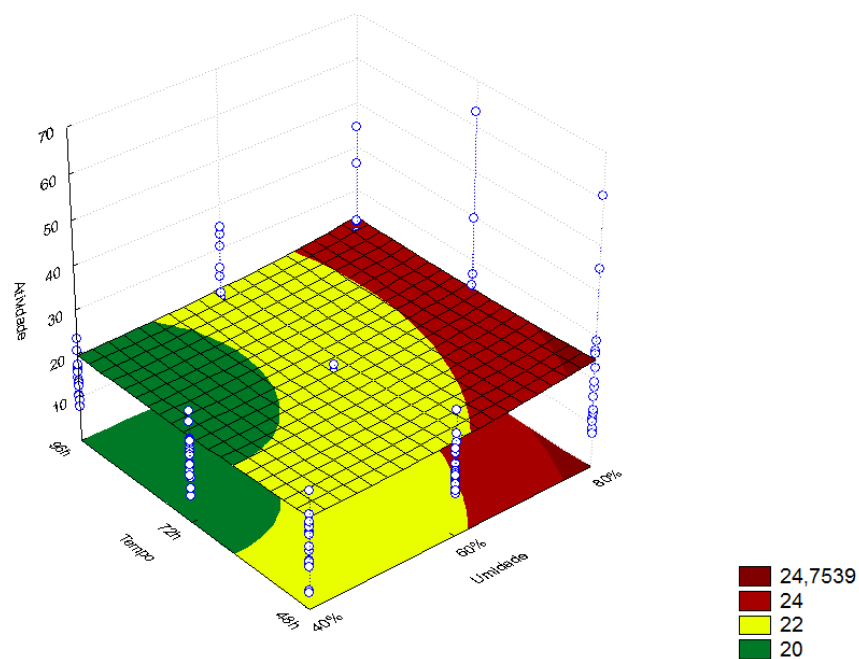


Figura 76. Atividade emulsificante de acordo com umidade e tempo de fermentação.

Os resultados de atividade mostram-se superiores quando utiliza-se 80% de umidade e 48h de tempo de fermentação, considerando farelo de trigo como substrato, tampão fosfato como umedecedor e glicerol como indutor. A Figura 77 mostra as médias da atividade em relação às condições fixadas.

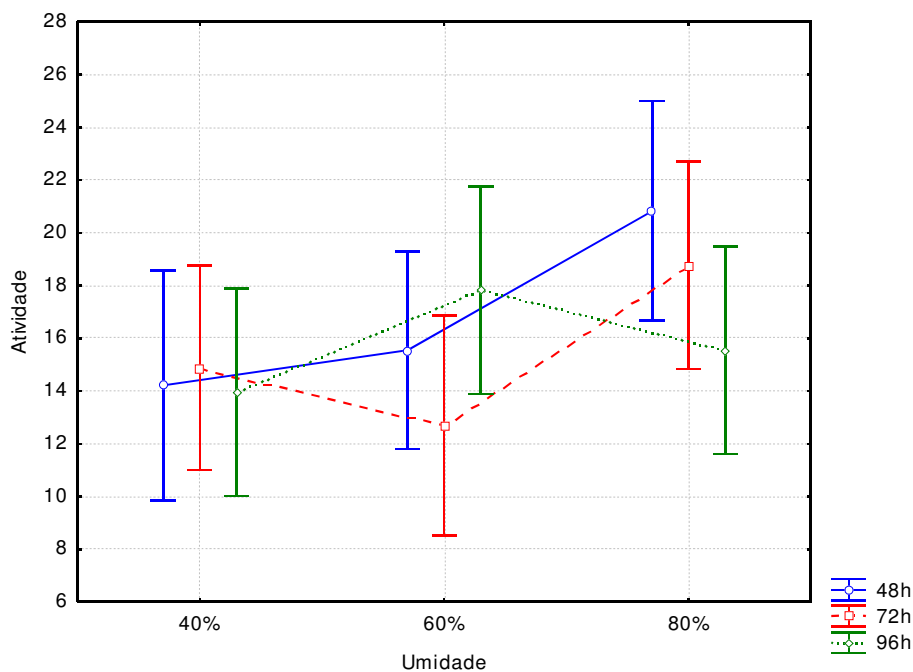


Figura 77. Médias da atividade emulsificante em relação à umidade e tempo de fermentação.

É possível observar (Figura 77) que o maior valor de atividade é verificado quando se utiliza a crueira como substrato e a manipueira como umedecedor, reiterando os resultados obtidos na superfície.

6.2.5 Análise Geral

Tabela 11. Condições ótimas de processo para cada variável dependente.

Fatores	Variáveis resposta (dependentes)			
	Tensão	Índice	Atividade ²	Produção
Substrato	Farelo de trigo	Farelo de trigo	Farelo / <u>Crueira</u>	Farelo de trigo
Umedecedor	Água	Tampão fosfato	Manipueira/ <u>Tampão fosfato</u>	Água
Indutor	Óleo de fritura	Óleo de fritura	Óleo de fritura	Óleo de fritura
Umidade	80%	40% ¹	80%	80%
Tempo ¹	48h	48h	48h	48h

¹Efeito não significativo na variável dependente.

²Atividade resultou valores significativos para farelo de trigo com manipueira ou crueira com tampão fosfato.

De uma forma geral, os resultados mostram a relevante eficiência do farelo de trigo como substrato, o óleo de fritura como indutor, a umidade de 80% como sendo a que apresentou melhores resultados, água como umedecedor nas variáveis: tensão superficial e produção (mais relevantes nesse trabalho) e o tempo de 48h de fermentação, tempo escolhido como parâmetro, pois não influenciou de forma significativa nas variáveis de resposta.

A manipueira não mostrou ser um bom umedecedor, apesar de ter apresentado resultados satisfatórios quando combinada com farelo de trigo para otimizar a atividade emulsificante. No entanto, a água exerceu grande relevância como umedecedor na maioria dos casos, destacando o tampão fosfato como umedecedor para índice de emulsificação e atividade emulsificante.

6.3. Aplicação de biossurfactante em reatores UASB

6.3.1 Água Residuária da Indústria de Laticínio

Os reatores tipo UASB começaram a ser alimentados buscando uma carga orgânica de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹, com 2% de biossurfactante (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise dos reatores UASB com DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹ e 2% de biossurfactante.

		DQO _e (mg/L)	pH _e	pH _s	DQO _{s-1} (mg/L)	DQO _{s-2} (mg/L)	Eficiência
Análise 1	Reator	2846	7,32	7,91	551	490	81,7%
	Controle	1960	7,14	8,03	286	260	86,0%
Análise 2	Reator	2745	7,41	8,12	294	280	89,5%
	Controle	2073	7,20	8,23	218	218	89,4%
Análise 3	Reator	2650	7,12	7,68	616	605	77,0%
	Controle	1851	7,10	7,89	438	439	76,0%
Análise 4	Reator	2997	7,05	7,63	449	465	84,7%
	Controle	1657	7,10	7,84	282	310	82,1%

O quadro mostra quatro análises feitas no reator tipo UASB, sendo adicionado o biossurfactante no reator, onde são analisados o pH de entrada (pH_e), o pH de saída (pH_s), a DQO de entrada (DQO_e), a DQO de saída (DQO_s) em duplicata e a eficiência obtida pelo reator.

O aumento significativo na DQO de entrada no reator é justificado pela adição do biossurfactante que eleva a quantidade de carga orgânica do efluente.

Foram feitas as análises também para a DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹ com adição de 5% (Tabela 13) e 8% (Tabela 14) de biossurfactante.

Tabela 13 – Análise dos reatores UASB com DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹ e 5% de biossurfactante.

		DQO _e (mg/L)	pH _e	pH _s	DQO _{s-1} (mg/L)	DQO _{s-2} (mg/L)	Eficiência
Análise	Reator	2950	7,61	8,66	536	629	80,2%
1	controle	2740	7,32	8,68	610	612	77,7%
Análise	Reator	2600	7,09	8,30	379	371	85,6%
2	controle	2510	7,01	8,34	497	499	80,2%
Análise	Reator	3560	7,12	7,49	309	405	90%
3	controle	2820	7,03	7,53	417	365	86,1%
Análise	Reator	3605	7,13	8,41	530	535	85,2%
4	controle	2180	7,04	8,54	376	388	82,5%

Tabela 14 – Análise dos reatores UASB com DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹ e 8% de biossurfactante.

		DQO _e (mg/L)	pH _e	pH _s	DQO _{s-1} (mg/L)	DQO _{s-2} (mg/L)	Eficiência
Análise	Reator	4945	7,16	8,36	898	947	81,3%
1	controle	3075	7,00	8,80	491	514	83,6%
Análise	Reator	4305	7,50	8,12	1173	1192	72,5%
2	controle	2225	7,01	8,34	766	805	63,8%
Análise	Reator	4343	7,57	7,89	1083	1084	75,0%
3	controle	3486	7,05	8,08	1098	1100	68,5%
Análise	Reator	4648	7,81	8,19	1047	1039	77,5%
4	controle	2973	7,33	8,25	1042	1048	64,8%

6.3.1.1 DQO

As eficiências estão representadas nas Figuras 78, 79 e 80. Nestas, pode-se observar que a redução da DQO no reator com adição do biossurfactante foi superior em quase todas as análises, exceto na primeira análise com 5% e 8%.

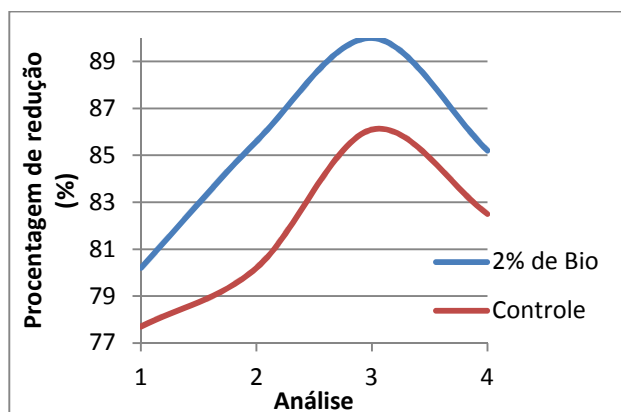


Figura 78 – Eficiência dos reatores tipo UASB com DQO 2000 mg.L⁻¹ e 2% de biossurfactante.

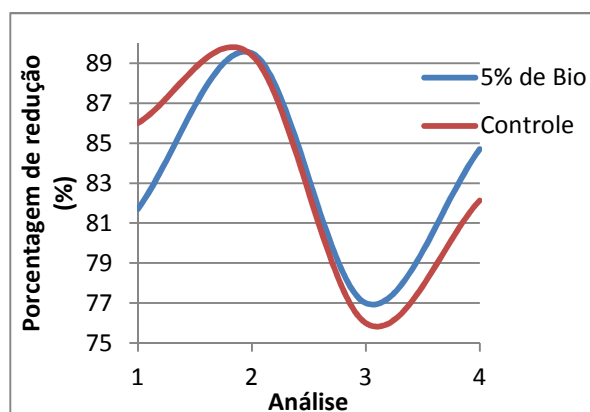


Figura 79 – Eficiência dos reatores tipo UASB com DQO 2000mg.L⁻¹ e 5% de biossurfactante.

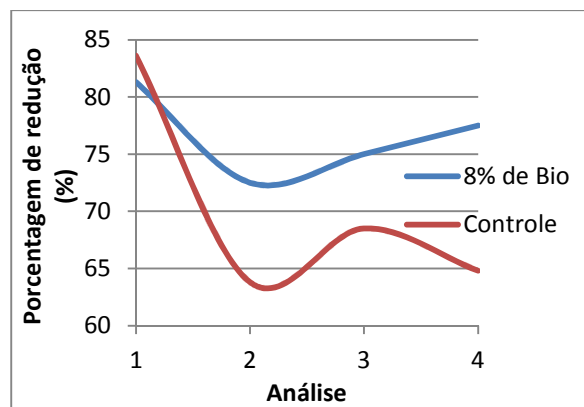


Figura 80 – Eficiência dos reatores tipo UASB com DQO 2000 mg.L⁻¹ e 8% de biossurfactante.

Analizando a Figura 80, pode-se observar claramente que as maiores diferenças nas eficiências do reator com adição de biossurfactante para o reator sem a adição nas análises com adição de 8% de biossurfactante, podendo ser ocasionada pela maior concentração do biossurfactante.

Porém, em termos de DQO final, os reatores sem a presença de biossurfactantes sempre apresentaram valores inferiores, o que significa que o biossurfactante foi realmente biodegradável, mas que sua incorporação ao meio não apresentou melhorias no sistema de tratamento anaeróbio.

6.3.1.2 pH

A variação obtidas pelo pH de entrada e saída dos reatores, sendo 1,1 para 2% (Tabela 12), 0,585 para 5% (Tabela 13) e 0,5 para 8% (Tabela 14) de biossurfactante. A média no aumento do pH nos reatores sem adição de biossurfactante foi superior ao reator com adição de 5 e 8%, saindo com uma elevação média de 1,0.

Esse aumento de pH foi uma variável positiva para o tratamento do efluente, sendo que o mesmo possui um valor de pH de aproximadamente 5 antes do seu ajuste de entrada.

6.3.1.3 Alcalinidade e Acidez

Os valores obtidos para alcalinidade acompanharam a mesma tendência do pH, sendo seu valor na saída do reator maior que a entrada (Tabela 15).

Tabela 15 – Média das alcalinidades de entrada e saída dos reatores UASB

Porcentagem de Biossurfactante	Reator	Alcalinidade _e (mg.L ⁻¹) de CaCO ₃	Alcalinidade _s (mg.L ⁻¹) de CaCO ₃
2%	reator	57,75	94,71
	controle	53,13	87,78
5%	reator	20,00	50,00
	controle	5,00	52,40
8%	Reator	77,00	111,00
	controle	39,00	52,00

Todas as análises de acidez de entrada e saída dos reatores obtiveram valor igual a zero, sendo explicado pelo fato de que a água residuária de entrada tem o seu pH ajustado para aproximadamente 7 sendo adicionado bicarbonato de sódio, tornando o meio alcalino.

6.3.1.4 Turbidez

Os valores médios encontrados para a turbidez da água de laticínio são apresentados no quadro (Tabela 16):

Tabela 16 – Média da turbidez de entrada e saída dos reatores UASB.

Porcentagem de Biossurfactante	Reator	Turbidez _e (NTU)	Turbidez _s (NTU)
2%	1	52,5	26,0
	controle	47,0	32,8
5%	1	173,0	42,2
	controle	65,0	21,2
8%	1	161,0	71,1
	controle	148,0	21,8

A redução da turbidez no reator com a adição de biossurfactante se mostrou mais eficiente do que no reator sem adição. Embora o valor na turbidez de entrada

da água residuária com biossurfactante seja elevado pela inserção do mesmo ao sistema, os resultados de saída são satisfatórios, uma vez que estes estão muitas vezes abaixo da turbidez de entrada da água residuária sem a adição de biossurfactante.

Porém, como os valores de turbidez dos efluentes dos reatores sem adição de biossurfactantes sempre se situam abaixo dos com adição, pode-se deduzir que a adição de biossurfactante não está sendo favorável ao sistema.

6.3.2 Água Residuária de Frigorífico

Foram realizadas as análises com a água residuária de frigorífico com carga orgânica de aproximadamente 2000 mg.L^{-1} , variando a concentração de biossurfactante em 2% (Tabela 17), 5% (Tabela 18) e 8% (Tabela 19) nos reatores tipo UASB.

Tabela 17 – Análise dos reatores UASB (reator e controle) com DQO de aproximadamente 2000 mg.L^{-1} e 2% de biossurfactante.

		DQO _e (mg.L^{-1})	DQO _s (mg.L^{-1})	NTU _e	NTU _s	pH _e	pH _s	Eficiência (%)
Análise 1	Reator	1730	520	41,4	41,6	7,2	7,7	69,94
	controle	1620	438	42,9	30,8	7,5	7,9	72,96
Análise 2	Reator	1500	491	20,2	46,8	7,4	7,7	67,27
	controle	1250	432	12,5	28,1	7,9	7,9	65,44
Análise 3	Reator	1650	347	97,9	61,6	6,4	8,2	78,97
	controle	1400	353	83,5	65	7,2	8,1	74,79
Análise 4	Reator	1730	435	102,3	59,6	5,5	7,3	74,86
	controle	1580	396	83,7	39,9	7,2	8,2	74,94

Tabela 18 – Análise dos reatores UASB (reator e controle) com DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹ e 5% de biossurfactante.

		DQO _e (mg.L ⁻¹)	DQO _s (mg.L ⁻¹)	NTU _e	NTU _s	pH _e	pH _s	Eficiência (%)
Análise 1	Reator	2300	523	127,4	62,8	5,8	7,3	77,26
	controle	1780	496	58,3	25,1	7,5	7,9	72,13
Análise 2	Reator	2950	1080	119	51,3	6,0	7,2	63,39
	controle	2780	704	70,7	68,9	7,8	7,8	74,68
Análise 3	Reator	1870	933	85,3	93,5	6,0	7,4	50,11
	controle	1670	926	65,8	34,7	7,2	7,6	44,55
Análise 4	Reator	3050	981	107	94,2	6,1	7,7	67,84
	controle	2770	697	54,8	49,4	7,7	7,9	74,84

Tabela 19 – Análise dos reatores UASB (reator e controle) com DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹ e 8% de biossurfactante.

		DQO _e (mg.L ⁻¹)	DQO _s (mg.L ⁻¹)	NTU _e	NTU _s	pH _e	pH _s	Eficiência (%)
Análise 1	Reator	1708	872	119	100	5,6	7,5	48,95
	controle	1228	805	68,9	91,4	7,7	7,9	34,45
Análise 2	Reator	2800	1300	174	106	5,9	8,0	53,57
	controle	2450	908	156	71,8	7,7	8,1	62,94
Análise 3	Reator	4530	1583	159	128	6,0	7,9	65,06
	controle	2770	1034	130	73,6	7,8	8,0	62,67
Análise 4	Reator	3740	1428	187	131	5,8	7,7	61,82
	controle	2830	984	130	80,6	7,6	7,9	65,23

6.3.2.1.DQO

As Figuras 81, 82 e 83, mostram os resultados obtidos através das eficiências calculadas para os reatores tipo UASB com adição de biossurfactante de 2, 5 e 8% respectivamente.

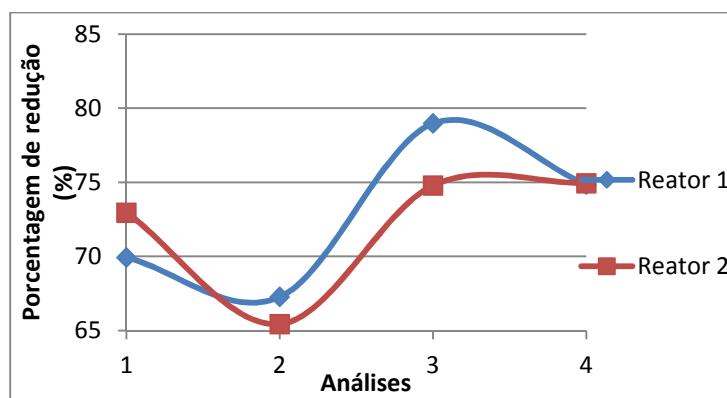


Figura 81 – Gráfico da eficiência dos reatores UASB com DQO de 2000 mg.L⁻¹ e 2% de biossurfactante (sendo, reator 1 com adição de biossurfactante e reator 2 reator controle).

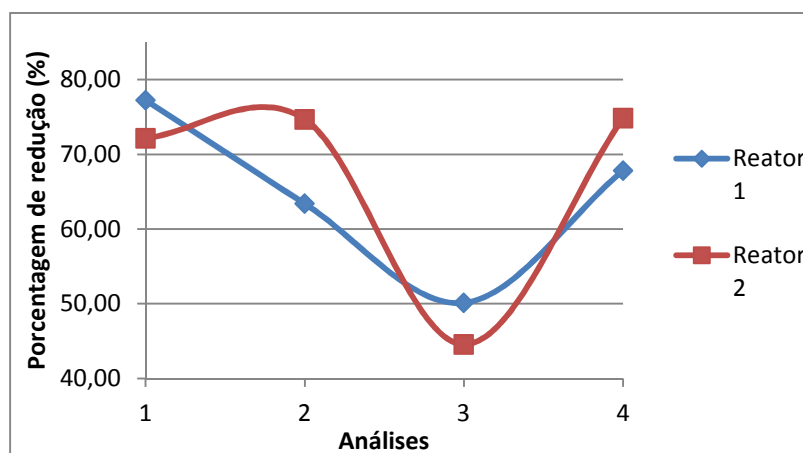


Figura 82 – Gráfico da eficiência dos reatores UASB com DQO de 2000 mg.L⁻¹ e 5% de biossurfactante (sendo, reator 1 com adição de biossurfactante e reator 2 reator controle).

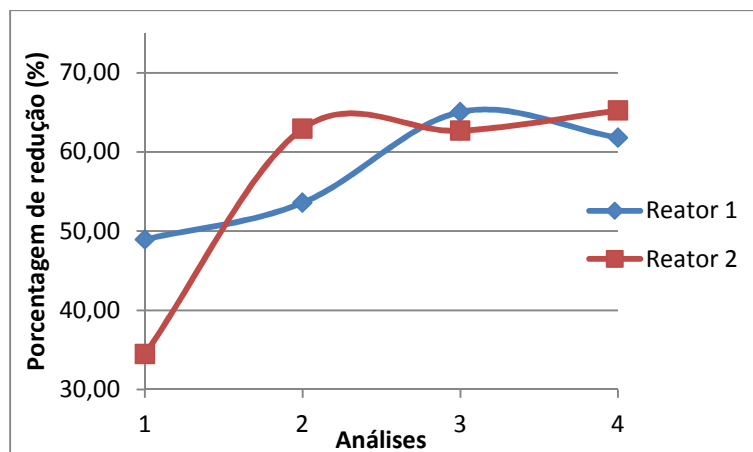


Figura 83 – Gráfico da eficiência dos reatores UASB com DQO de 2000mg.L⁻¹ e 8% de biossurfactante (sendo, reator 1 com adição de biossurfactante e reator 2 reator controle).

Em geral pode-se observar que os reatores tipo UASB obtiveram uma eficiência média de 64,9% para o reator (com adição de biossurfactante) e 65% para o reator controle (sem adição de biossurfactante).

6.3.2.2 pH

As análises de pH revelaram uma boa capacidade de recuperação do sistema, sendo que o pH de entrada do efluente com adição de biossurfactante (pH≈ 4,5) foi inferior ao pH do efluente sem adição do biossurfactante, variando proporcionalmente a porcentagem e biossurfactante adicionado ao sistema.

O pH de saída variou entre 7,2 e 8,2 sendo este intervalo ótimo para os micro-organismos presentes no inóculo.

6.3.2.3 Alcalinidade e Acidez

As médias dos resultados para a análise de alcalinidade estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Média das alcalinidades de entrada e saída dos reatores UASB com água residuária de frigorífico.

Porcentagem de Biossurfactante	Reator	Alcalinidade _e (mg.L ⁻¹) de CaCO ₃	Alcalinidade _s (mg.L ⁻¹) de CaCO ₃
2%	1	186,3	204,7
	controle	345,2	387,6
5%	1	152,8	243,6
	controle	210,1	271,4
8%	1	276,4	308,2
	controle	239	341,7

Analisando as alcalinidades encontradas pode-se notar que houve uma elevação na alcalinidade, sendo obtidas médias maiores nos reatores compartimentados, seguindo a tendência dos resultados de determinação de pH encontrados.

6.3.2.4 Turbidez

Observando os resultados de turbidez (Tabela 17, 18 e 19), nota-se que a adição do biossurfactante elevou a turbidez no reator, não proporcionando uma influência positiva na redução da turbidez de saída.

7. CONCLUSÕES

Os valores de tensão superficial, índice de emulsificação e produção de biossurfactante tanto por *Bacillus amyloliquefaciens* como por *Bacillus subtilis* foram similares quando utilizado o farelo de trigo como substrato.

A adição de óleo de fritura como indutor influenciou positivamente a produção de biossurfactante e a redução de tensão superficial em ambos micro-organismos.

No tratamento anaeróbio com reatores UASB utilizando água residuária da indústria de laticínio e frigorífico nota-se que a adição de biossurfactante não está influenciando positivamente na redução de DQO.

O biossurfactante não causa influências positivas ou negativas na redução da carga orgânica, na variação de pH e na alcalinidade, podendo ainda afirmar sua alta capacidade de biodegradação.

8. REFERENCIAS

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**, 16th ed., 1995.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AWWA – AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WEF – WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**.ed.19, 1995.

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.

BARBER, W. P; STUCKEY, D. C. The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: A review. **Water Research**, v.33, p.1559-1578, 1999.

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, 2007.

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

BUENO, S. M. **Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo**. 89 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2008.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*** 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**. 158 f. tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, 2010.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewaters with high oil and grease content. **Bioresource Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210, 2006.

CASTIGLIONI, G. L. **Modelagem e simulação da produção de biossurfactante e lipase por fermentação em estado sólido**. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

CERQUEIRA, V. S. **Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados**. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande, 2007.

CHANG, I. S., CHUNG, C. M., HAN, S. H. Treatment of oily wastewater by ultrafiltration and ozone. **Desalination**, v. 133, p. 225-232, 2001.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. v.5. Editora UFMG. 1997.

CNPC - CONSELHO NACIONAL DA PECUÁRIA DE CORTE. **Balanco da pecuária bovina de corte**. Disponível em <http://www.cnpc.org.br>. Acesso em 14/02/2014.

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.

COSTA, G. A. N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. 87 f. Dissertação de (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.

DAMASCENO, S. **Cultivo de *Geotrichum fragrans* em manipueira**. 114 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, 1999.

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.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. (2001), **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v.3, cap. 13.2001.

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.

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

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.

GAVALA, H. N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I. V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 73, n. 1, p. 59-63, 1999.

GU, X.; ZHENG, Z.; YU, H.; WANG, J.; LIANG, F.; LIU, R. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochemistry**. v. 4 p. 3196-3201, 2005.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 379-387, 2000.

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 *Rhodotorula glutinis* II P-30. **Biotechnology Letters**. v. 14, n.6 p.487-490, 1992.

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

LEAL, M. C. M. R., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D .M. G., SANT'ANNA JR., G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. **Brazilian Journal Chemistry. Engineering**, v. 19, p.175–180, 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.

LEVISAUSAKAS.D.;GALVANAUSKAS, V.; ZUNDA, G.; GRIGISKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandi*. **Biotechnology letters**. v. 26, p. 1141-1146, 2004.

LI, Z; WRENN, B. A. Effects of ferric hydroxide on the anaerobic biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil in freshwater sediments. **Water Research**, v. 38, p. 3859-3868, 2004.

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

LIU, L., NAKHLA, G., BASSI, A., 2004. Treatability and kinetics of mesophilic of high oil and grease pet food wastewater. **Journal Hazard Mater**, v. 112, 87–94, 2004.

MAGET-DANA, R.; PTAK, M. Interactions of surfactin with membrane models. **Biophysical Journal**, v. 68, p.1937-1943, 1995.

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

MARÓSTICA JR. M. R.; PASTORE, G. M. Production of R-(+)-_terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chemistry**. v. 101, p. 345-350, 2007.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.1942-1947, 2008.

MASSE,,L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource. Technology**. 77, p. 145–155, 2001.

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 em Química Orgânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradação de Águas Residuárias de Laticínios Previamente Tratadas pos Lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 143-149, 2006.

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.

MESS, J. B. R. **Uso de Aguapé (Eichhorniacrassipes) em sistema de tratamento de efluente de matadouro e frigorífico e avaliação de sua compostagem**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado) – UNIOESTE, Cascavel, 2006.

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**. 118 f. 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 applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, n. 2, p.183-198, 2005.

NAKHLA, G.; AL-SABAWI, M.; BASSI, A.; LIU, V. **Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater**. Journal of Hazardous Materials, v. 102, p. 243–255, 2003.

NEVES, V. J. M. **Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino**. 64 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

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

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

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

OMIL, F.; GARRIDO, J.M.; ARROJO, B.; MENDEZ, R. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. **Water Research**. v. 37, p. 4099-4108, 2003.

PACHECO, J. W. **Guia técnico ambiental de frigoríficos - industrialização de carnes (bovina e suína)**. São Paulo: CETESB, 85 p. 2006.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

PERLE, M.; KIMCHIE, S.; SHELEF, G. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. **Water Research**, v. 29, n. 6, p. 1549-1554, 1995.

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

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

POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology letters**. v. 16, p. 363-366, 1994.

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.

ROSA, D. R. **Tratamento Enzimático/Biológico de Efluentes com Alto Teor de Gordura**. 107 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro), 2004.

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

SEBRAE, - **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**. Disponível em: sebrae.com.br. Acesso em 17/02/2014.

SILVA, M. O. S. A. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgoto**. CETESB, São Paulo, 1977.

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

SOBREIRA, E.H. **Estudo do tratamento de água residuária de indústria de processo de óleos pelo sistema de lodo ativado com adição de microrganismo produtor de biossurfactante**. 2004.126 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

STRAPASSON, R.A.N. **Otimização das variáveis do bioprocesso de fermentação no estado sólido para produção de ácido fumárico a partir de resíduos agroindustriais, utilizando redes neurais**. 123 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Paraná, Curitiba, 2003.

UNEP – UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; DEPA – DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; COWI. **Cleaner production assessment in meat processing**. Paris: UNEP, 2000. Disponível em <http://www.agrifood-forum.net/publications/guide/index.htm>. Acesso 14/02/2014.

UYSAL, A.; TURKMAN, A. Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor, **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2745–2749, 2005.

VEENANADIG, N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 231-239, 2000.

VILAS BOAS, E. V. B.; LIMA, L. C. O.; BRESSAN, M. C.; BARCELOS, M. F. P.; PEREIRA, R. G. F. A. **Manejo de resíduos da agroindústria**. Lavras: Gráfica Universitária UFLA/FAEPE, 2001.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos ao tratamento de esgoto**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 211 p. v. 2. 1996.

WEI, Y.; LAI, C.; CHANG, J. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC21332. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 40-45, 2007.

WEI, Y.; CHU, I. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnonolgy Letters**.v. 24, p. 479-482, 2002.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 979-983, 2004.

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.

ZHANG, C.; VALSARAJ, K.T; CONSTANT, W.D.; ROY D. Nutrient and surfactant enhancement for the biodegradation of chlorinated hydrocarbons in the wastewater from a Louisiana Superfund site. **Journal Hazard Mater**, v. 62, p. 41–58, 1998.

ANEXO

PLANILHA DE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

icro	substrato	umedecedor	indutor	umidade	tempo	tensão	índice (24h)	atividade	peso
subtilis	trigo	tampão	glicerol	40	48	40	5	21,37	1,29
subtilis	trigo	tampão	glicerol	40	48	39	10	23,06	2,13
subtilis	trigo	tampão	glicerol	60	96	38	25	22,17	1,31
subtilis	trigo	tampão	glicerol	60	96	38	45	22,38	0,79
subtilis	trigo	tampão	glicerol	80	72	38	55	23,91	2,21
subtilis	trigo	tampão	glicerol	80	72	38	30	22,87	4,41
subtilis	trigo	tampão	óleo	40	96	33	7,5	7,89	1,01
subtilis	trigo	tampão	óleo	40	96	35	2,5	9,56	0,62
subtilis	trigo	tampão	óleo	60	72	34	40	23,01	1,33
subtilis	trigo	tampão	óleo	60	72	33	62,5	20,04	1,61
subtilis	trigo	tampão	óleo	80	48	33	20	1,39	2,18
subtilis	trigo	tampão	óleo	80	48	33	50	3,01	3,19
subtilis	trigo	tampão	água	40	72	39	67,5	35,85	0,84
subtilis	trigo	tampão	água	40	72	37	60	32,55	0,62
subtilis	trigo	tampão	água	60	48	39	60	18	0,75
subtilis	trigo	tampão	água	60	48	37	65	20,6	0,94
subtilis	trigo	tampão	água	80	96	40	67,5	41,15	1,82
subtilis	trigo	tampão	água	80	96	41	62,5	40,2	1,96
subtilis	trigo	mani	glicerol	40	96	39	47,5	19,31	0,5
subtilis	trigo	mani	glicerol	40	96	37	20	24,79	0,44
subtilis	trigo	mani	glicerol	60	72	38	7,5	10,68	0,54
subtilis	trigo	mani	glicerol	60	72	39	7,5	14,42	0,33
subtilis	trigo	mani	glicerol	80	48	39	57,5	22,2	0,52
subtilis	trigo	mani	glicerol	80	48	39	25	19,6	0,52
subtilis	trigo	mani	óleo	40	72	34	52,5	14,1	2,78
subtilis	trigo	mani	óleo	40	72	33	25	12,86	1,46
subtilis	trigo	mani	óleo	60	48	32	77,5	5,15	4,47
subtilis	trigo	mani	óleo	60	48	33	22,5	3,11	2,69

subtilis	trigo	mani	óleo	80	96	33	65	17,79	1,15
subtilis	trigo	mani	óleo	80	96	33	70	10,65	1,89
subtilis	trigo	mani	água	40	48	42	47,5	22,85	5,56
subtilis	trigo	mani	água	40	48	42	62,5	27,45	3,25
subtilis	trigo	mani	água	60	96	38	65	37,65	1,3
subtilis	trigo	mani	água	60	96	37	62,5	35,55	1,78
subtilis	trigo	mani	água	80	72	41	70	51,3	8,79
subtilis	trigo	mani	água	80	72	44	65	49,3	5,96
subtilis	trigo	água	glicerol	40	72	36	62,5	7,64	0,43
subtilis	trigo	água	glicerol	40	72	36	30	4,65	0,59
subtilis	trigo	água	glicerol	60	48	36	7,5	17,42	0,49
subtilis	trigo	água	glicerol	60	48	36	5	12,24	0,54
subtilis	trigo	água	glicerol	80	96	35	62,5	17,26	1,64
subtilis	trigo	água	glicerol	80	96	35	30	15,36	1,34
subtilis	trigo	água	óleo	40	48	37	65	31,24	0,62
subtilis	trigo	água	óleo	40	48	37	60	35,65	0,41
subtilis	trigo	água	óleo	60	96	38	65	23	2,17
subtilis	trigo	água	óleo	60	96	35	65	20	1,16
subtilis	trigo	água	óleo	80	72	35	65	12,35	3,45
subtilis	trigo	água	óleo	80	72	34	57,5	10,15	2,39
subtilis	trigo	água	água	40	96	38	60	20,9	1,22
subtilis	trigo	água	água	40	96	39	65	23,1	0,98
subtilis	trigo	água	água	60	72	41	60	15,02	0,51
subtilis	trigo	água	água	60	72	40	65	14,15	1,37
subtilis	trigo	água	água	80	48	37	65	13,6	1,43
subtilis	trigo	água	água	80	48	38	65	16,7	1,02
subtilis	crueira	tampão	glicerol	40	96	56	5	8,35	0,23
subtilis	crueira	tampão	glicerol	40	96	54	2,5	7	0,45
subtilis	crueira	tampão	glicerol	60	72	42	2,5	18,35	0,24

subtilis	crueira	tampão	glicerol	60	72	44	2,5	21,9	0,41
subtilis	crueira	tampão	glicerol	80	48	45	5	14,6	0,28
subtilis	crueira	tampão	glicerol	80	48	50	2,5	17,3	0,29
subtilis	crueira	tampão	óleo	40	72	48	10	14,95	0,16
subtilis	crueira	tampão	óleo	40	72	40	5	15,1	0,32
subtilis	crueira	tampão	óleo	60	48	34	12,5	11,65	0,23
subtilis	crueira	tampão	óleo	60	48	42	37,5	10,15	0,23
subtilis	crueira	tampão	óleo	80	96	34	2,5	14,65	6,24
subtilis	crueira	tampão	óleo	80	96	34	2,5	12,1	8,48
subtilis	crueira	tampão	água	40	48	49	42,5	16,75	0,34
subtilis	crueira	tampão	água	40	48	59	27,5	13,55	1,03
subtilis	crueira	tampão	água	60	96	49	2,5	17,5	0,33
subtilis	crueira	tampão	água	60	96	50	10	17,95	0,24
subtilis	crueira	tampão	água	80	72	50	35	23,25	0,81
subtilis	crueira	tampão	água	80	72	49	37,5	19,7	0,53
subtilis	crueira	mani	glicerol	40	72	51	2,5	17,3	0,26
subtilis	crueira	mani	glicerol	40	72	48	2,5	18,6	0,45
subtilis	crueira	mani	glicerol	60	48	54	2,5	16,1	1,25
subtilis	crueira	mani	glicerol	60	48	57	2,5	20	0,86
subtilis	crueira	mani	glicerol	80	96	59	27,5	13,9	1,71
subtilis	crueira	mani	glicerol	80	96	51	37,5	19,35	2,27
subtilis	crueira	mani	óleo	40	48	52	2,5	26,55	0,63
subtilis	crueira	mani	óleo	40	48	50	2,5	34,5	0,88
subtilis	crueira	mani	óleo	60	96	45	2,5	68,1	0,56
subtilis	crueira	mani	óleo	60	96	47	5	72,05	0,77
subtilis	crueira	mani	óleo	80	72	48	2,5	61,55	0,56
subtilis	crueira	mani	óleo	80	72	48	5	58,4	0,79
subtilis	crueira	mani	água	40	96	59	7,5	43,75	0,56
subtilis	crueira	mani	água	40	96	51	2,5	36,3	0,72

subtilis	crueira	mani	água	60	72	53	2,5	78,6	0,33
subtilis	crueira	mani	água	60	72	43	2,5	70,15	0,59
subtilis	crueira	mani	água	80	48	47	2,5	23,95	0,76
subtilis	crueira	mani	água	80	48	50	2,5	20,3	0,57
subtilis	crueira	água	glicerol	40	48	57	2,5	47,95	0,01
subtilis	crueira	água	glicerol	40	48	53	2,5	42,9	0,07
subtilis	crueira	água	glicerol	60	96	48	2,5	19,65	0,85
subtilis	crueira	água	glicerol	60	96	51	2,5	22,15	0,95
subtilis	crueira	água	glicerol	80	72	45	2,5	47,6	1,65
subtilis	crueira	água	glicerol	80	72	49	5	38,1	2,25
subtilis	crueira	água	óleo	40	96	43	2,5	19,2	0,66
subtilis	crueira	água	óleo	40	96	36	2,5	11,15	0,88
subtilis	crueira	água	óleo	60	72	41	40	5,8	0,38
subtilis	crueira	água	óleo	60	72	40	50	3,6	0,69
subtilis	crueira	água	óleo	80	48	33	7,5	8,5	0,65
subtilis	crueira	água	óleo	80	48	33	7,5	10,9	0,57
subtilis	crueira	água	água	40	72	60	10	8,75	1,04
subtilis	crueira	água	água	40	72	57	5	10,4	1,1
subtilis	crueira	água	água	60	48	65	7,5	10,54	0,85
subtilis	crueira	água	água	60	48	64	5	11,95	0,89
subtilis	crueira	água	água	80	96	65	5	8,05	1,12
subtilis	crueira	água	água	80	96	65	5	10	0,94
subtilis	bagaço	tampão	glicerol	40	72	65	12,5	8,9	1,12
subtilis	bagaço	tampão	glicerol	40	72	65	10	10,66	1,21
subtilis	bagaço	tampão	glicerol	60	48	67	5	8,35	0,77
subtilis	bagaço	tampão	glicerol	60	48	67	12,5	12,75	0,58
subtilis	bagaço	tampão	glicerol	80	96	57	17,5	14,6	1,19
subtilis	bagaço	tampão	glicerol	80	96	61	5	12,6	0,95
subtilis	bagaço	tampão	óleo	40	48	60	12,5	16,1	0,75

subtilis	bagaço	tampão	óleo	40	48	63	10	15,5	0,92
subtilis	bagaço	tampão	óleo	60	96	53	7,5	12,5	1,2
subtilis	bagaço	tampão	óleo	60	96	53	10	10,25	1,15
subtilis	bagaço	tampão	óleo	80	72	53	17,5	18,8	1,31
subtilis	bagaço	tampão	óleo	80	72	52	12,5	16,7	1,29
subtilis	bagaço	tampão	água	40	96	66	12,5	10,2	0,79
subtilis	bagaço	tampão	água	40	96	66	12,5	9,8	1,12
subtilis	bagaço	tampão	água	60	72	67	12,5	6,3	0,85
subtilis	bagaço	tampão	água	60	72	66	7,5	8,25	0,59
subtilis	bagaço	tampão	água	80	48	66	12,5	20,95	0,88
subtilis	bagaço	tampão	água	80	48	64	7,5	19,35	0,67
subtilis	bagaço	mani	glicerol	40	48	63	15	19,65	1,35
subtilis	bagaço	mani	glicerol	40	48	65	12,5	17,3	1,24
subtilis	bagaço	mani	glicerol	60	96	65	5	9	1,57
subtilis	bagaço	mani	glicerol	60	96	64	5	12,3	1,74
subtilis	bagaço	mani	glicerol	80	72	66	12,5	20,7	0,91
subtilis	bagaço	mani	glicerol	80	72	65	12,5	18	1,33
subtilis	bagaço	mani	óleo	40	96	51	2,5	31,15	0,84
subtilis	bagaço	mani	óleo	40	96	52	2,5	33,65	0,53
subtilis	bagaço	mani	óleo	60	72	52	7,5	15,25	0,71
subtilis	bagaço	mani	óleo	60	72	52	2,5	19,8	1,07
subtilis	bagaço	mani	óleo	80	48	53	27,5	10,25	1,07
subtilis	bagaço	mani	óleo	80	48	52	12,5	13,65	2,03
subtilis	bagaço	mani	água	40	72	63	2,5	5,85	1,02
subtilis	bagaço	mani	água	40	72	54	7,5	8,05	1,07
subtilis	bagaço	mani	água	60	48	56	2,5	7,55	1,03
subtilis	bagaço	mani	água	60	48	61	2,5	5,5	1,13
subtilis	bagaço	mani	água	80	96	59	27,5	10,1	0,94
subtilis	bagaço	mani	água	80	96	60	12,5	13,2	0,61

subtilis	bagaço	água	glicerol	40	96	65	2,5	10,7	1,27
subtilis	bagaço	água	glicerol	40	96	65	2,5	12,95	1,12
subtilis	bagaço	água	glicerol	60	72	62	5	9,75	1,59
subtilis	bagaço	água	glicerol	60	72	63	2,5	8,95	1,38
subtilis	bagaço	água	glicerol	80	48	64	7,5	4,5	1,81
subtilis	bagaço	água	glicerol	80	48	64	2,5	5,85	1,57
subtilis	bagaço	água	óleo	40	72	66	12,5	8,55	0,93
subtilis	bagaço	água	óleo	40	72	65	17,5	5,6	0,75
subtilis	bagaço	água	óleo	60	48	60	20	8,55	0,63
subtilis	bagaço	água	óleo	60	48	55	2,5	9,5	0,64
subtilis	bagaço	água	óleo	80	96	51	2,5	6,35	0,9
subtilis	bagaço	água	óleo	80	96	51	5	7,15	0,79
subtilis	bagaço	água	água	40	48	49	2,5	22,6	0,24
subtilis	bagaço	água	água	40	48	53	5	18,05	0,13
subtilis	bagaço	água	água	60	96	54	5	13,75	0,44
subtilis	bagaço	água	água	60	96	57	5	16,7	0,22
subtilis	bagaço	água	água	80	72	63	5	7,6	0,57
subtilis	bagaço	água	água	80	72	52	2,5	9,1	0,27
amylo	trigo	tampão	glicerol	40	48	48	12,5	15,95	0,65
amylo	trigo	tampão	glicerol	40	48	46	10	17,55	1,06
amylo	trigo	tampão	glicerol	60	96	44	15	18,85	1,3
amylo	trigo	tampão	glicerol	60	96	39	37,5	20,65	0,99
amylo	trigo	tampão	glicerol	80	72	38	55	26,75	1,46
amylo	trigo	tampão	glicerol	80	72	39	30	22,85	1,44
amylo	trigo	tampão	óleo	40	96	38	7,5	15,45	1,27
amylo	trigo	tampão	óleo	40	96	36	5	18,55	2,27
amylo	trigo	tampão	óleo	60	72	35	22,5	21,55	1,09
amylo	trigo	tampão	óleo	60	72	37	50	19,95	1,53
amylo	trigo	tampão	óleo	80	48	33	25	22,8	2,67

amylo	trigo	tampão	óleo	80	48	33	50	19,55	2,74
amylo	trigo	tampão	água	40	72	34	67,5	21,5	0,93
amylo	trigo	tampão	água	40	72	35	60	19,75	1,47
amylo	trigo	tampão	água	60	48	37	60	14,4	0,9
amylo	trigo	tampão	água	60	48	37	65	12,75	0,93
amylo	trigo	tampão	água	80	96	36	67,5	16,3	3,51
amylo	trigo	tampão	água	80	96	39	62,5	19,3	2,65
amylo	trigo	mani	glicerol	40	96	41	37,5	18,95	0,94
amylo	trigo	mani	glicerol	40	96	45	10	23	1,11
amylo	trigo	mani	glicerol	60	72	46	7,5	28,55	2,3
amylo	trigo	mani	glicerol	60	72	45	7,5	23,4	2
amylo	trigo	mani	glicerol	80	48	46	57,5	44,45	2
amylo	trigo	mani	glicerol	80	48	43	30	36,2	1,74
amylo	trigo	mani	óleo	40	72	39	25	11,1	5,53
amylo	trigo	mani	óleo	40	72	39	10	9,6	3,65
amylo	trigo	mani	óleo	60	48	39	57,5	18,8	3,54
amylo	trigo	mani	óleo	60	48	40	25	25,5	2,74
amylo	trigo	mani	óleo	80	96	40	50	26,9	2,64
amylo	trigo	mani	óleo	80	96	38	55	19,2	6,84
amylo	trigo	mani	água	40	48	41	17,5	23,5	1,91
amylo	trigo	mani	água	40	48	44	47,5	20,9	0,92
amylo	trigo	mani	água	60	96	48	47	9,05	3,08
amylo	trigo	mani	água	60	96	46	10	7,8	3,15
amylo	trigo	mani	água	80	72	48	10	12,6	2,56
amylo	trigo	mani	água	80	72	44	55	19,65	3,13
amylo	trigo	água	glicerol	40	72	36	50	17,75	2,49
amylo	trigo	água	glicerol	40	72	35	12,5	26,55	3,01
amylo	trigo	água	glicerol	60	48	36	50	14,6	1,89
amylo	trigo	água	glicerol	60	48	36	50	14,35	2,08

amylo	trigo	água	glicerol	80	96	37	50	6	3,29
amylo	trigo	água	glicerol	80	96	38	50	8,5	2,74
amylo	trigo	água	óleo	40	48	34	52,5	16,4	1,86
amylo	trigo	água	óleo	40	48	34	45	12,7	2,87
amylo	trigo	água	óleo	60	96	34	37,5	13,25	1,87
amylo	trigo	água	óleo	60	96	34	62,5	10,05	2,01
amylo	trigo	água	óleo	80	72	32	25	29	7,81
amylo	trigo	água	óleo	80	72	32	12,5	16,3	20,58
amylo	trigo	água	água	40	96	42	40	11,7	0,89
amylo	trigo	água	água	40	96	39	22,5	13,3	1,69
amylo	trigo	água	água	60	72	39	42,5	9,7	2,19
amylo	trigo	água	água	60	72	42	17,5	14,05	1,27
amylo	trigo	água	água	80	48	39	52,5	9,6	2,97
amylo	trigo	água	água	80	48	38	52,5	10,85	1,55
amylo	crueira	tampão	glicerol	40	96	65	2,5	19,25	1,32
amylo	crueira	tampão	glicerol	40	96	62	5	18,6	1,3
amylo	crueira	tampão	glicerol	60	72	57	2,5	18,4	1,26
amylo	crueira	tampão	glicerol	60	72	58	0	19,75	1,29
amylo	crueira	tampão	glicerol	80	48	52	0	63,15	1,02
amylo	crueira	tampão	glicerol	80	48	50	5	39,7	2,24
amylo	crueira	tampão	óleo	40	72	50	0	10,6	1,3
amylo	crueira	tampão	óleo	40	72	50	0	13,5	0,76
amylo	crueira	tampão	óleo	60	48	51	2,5	10,3	1,71
amylo	crueira	tampão	óleo	60	48	51	2,5	15,3	1,98
amylo	crueira	tampão	óleo	80	96	45	5	45	1,66
amylo	crueira	tampão	óleo	80	96	36	2,5	60,75	2,79
amylo	crueira	tampão	água	40	48	53	2,5	13,45	0,87
amylo	crueira	tampão	água	40	48	56	5	6,05	0,9
amylo	crueira	tampão	água	60	96	57	2,5	12,65	1,15

amylo	crueira	tampão	água	60	96	56	2,5	10,4	1,37
amylo	crueira	tampão	água	80	72	56	2,5	8,6	1,51
amylo	crueira	tampão	água	80	72	55	2,5	7,5	1,69
amylo	crueira	mani	glicerol	40	72	53	7,5	13	0,58
amylo	crueira	mani	glicerol	40	72	53	7,5	8	0,48
amylo	crueira	mani	glicerol	60	48	52	10	12,85	1
amylo	crueira	mani	glicerol	60	48	52	7,5	8,25	0,93
amylo	crueira	mani	glicerol	80	96	53	0	9,05	1,03
amylo	crueira	mani	glicerol	80	96	53	2,5	7,9	1,47
amylo	crueira	mani	óleo	40	48	50	5	16,05	0,42
amylo	crueira	mani	óleo	40	48	50	0	10,75	0,49
amylo	crueira	mani	óleo	60	96	49	7,5	16,7	0,56
amylo	crueira	mani	óleo	60	96	50	0	14,4	0,51
amylo	crueira	mani	óleo	80	72	50	0	8,05	1,2
amylo	crueira	mani	óleo	80	72	48	7,5	12,85	0,86
amylo	crueira	mani	água	40	96	51	2,5	10,2	0,36
amylo	crueira	mani	água	40	96	51	5	7,7	0,42
amylo	crueira	mani	água	60	72	52	2,5	10,25	0,91
amylo	crueira	mani	água	60	72	53	5	11,4	0,67
amylo	crueira	mani	água	80	48	52	2,5	6,45	0,27
amylo	crueira	mani	água	80	48	51	0	5,4	0,15
amylo	crueira	água	glicerol	40	48	51	0	13,55	0,44
amylo	crueira	água	glicerol	40	48	52	0	15,35	0,23
amylo	crueira	água	glicerol	60	96	52	7,5	11,1	0,56
amylo	crueira	água	glicerol	60	96	52	7,5	14,9	0,38
amylo	crueira	água	glicerol	80	72	51	7,5	22,65	2,47
amylo	crueira	água	glicerol	80	72	47	2,5	19,95	2
amylo	crueira	água	óleo	40	96	50	2,5	14,4	0,75
amylo	crueira	água	óleo	40	96	50	5	10,85	0,49

amylo	crueira	água	óleo	60	72	48	0	9,6	0,35
amylo	crueira	água	óleo	60	72	50	2,5	13,5	0,26
amylo	crueira	água	óleo	80	48	49	2,5	5,6	0,47
amylo	crueira	água	óleo	80	48	49	2,5	11,6	0,89
amylo	crueira	água	água	40	72	51	10	8,05	0,86
amylo	crueira	água	água	40	72	51	2,5	12,75	0,85
amylo	crueira	água	água	60	48	52	2,5	10,9	0,63
amylo	crueira	água	água	60	48	52	7,5	11,15	0,79
amylo	crueira	água	água	80	96	52	0	8,25	0,49
amylo	crueira	água	água	80	96	53	12,5	13,25	0,39
amylo	bagaço	tampão	glicerol	40	72	67	15	12,65	0,39
amylo	bagaço	tampão	glicerol	40	72	66	15	18,8	0,24
amylo	bagaço	tampão	glicerol	60	48	68	5	12,25	0,25
amylo	bagaço	tampão	glicerol	60	48	67	2,5	12	0,46
amylo	bagaço	tampão	glicerol	80	96	67	2,5	4,05	0,25
amylo	bagaço	tampão	glicerol	80	96	68	17,5	2,75	0,49
amylo	bagaço	tampão	óleo	40	48	63	2,5	4,4	0,44
amylo	bagaço	tampão	óleo	40	48	56	5	3,9	0,35
amylo	bagaço	tampão	óleo	60	96	56	7,5	8,85	0,68
amylo	bagaço	tampão	óleo	60	96	56	5	6,65	0,31
amylo	bagaço	tampão	óleo	80	72	57	2,5	19,95	0,46
amylo	bagaço	tampão	óleo	80	72	56	2,5	14,65	0,37
amylo	bagaço	tampão	água	40	96	56	5	12,7	0,47
amylo	bagaço	tampão	água	40	96	57	5	9,35	0,65
amylo	bagaço	tampão	água	60	72	58	7,5	14	0,04
amylo	bagaço	tampão	água	60	72	62	5	11,9	0,1
amylo	bagaço	tampão	água	80	48	63	5	15,95	0,14
amylo	bagaço	tampão	água	80	48	65	5	17	0,2
amylo	bagaço	mani	glicerol	40	48	69	2,5	16,95	0,49

amylo	bagaço	mani	glicerol	40	48	63	12,5	16,9	0,25
amylo	bagaço	mani	glicerol	60	96	68	5	33,1	0,01
amylo	bagaço	mani	glicerol	60	96	68	2,5	34,9	0,01
amylo	bagaço	mani	glicerol	80	72	66	12,5	18,5	0,13
amylo	bagaço	mani	glicerol	80	72	66	7,5	19,85	0,36
amylo	bagaço	mani	óleo	40	96	59	2,5	17,25	0,2
amylo	bagaço	mani	óleo	40	96	60	2,5	13,8	0,16
amylo	bagaço	mani	óleo	60	72	57	5	16,65	0,24
amylo	bagaço	mani	óleo	60	72	57	5	12,65	0,33
amylo	bagaço	mani	óleo	80	48	57	5	18,45	0,66
amylo	bagaço	mani	óleo	80	48	57	2,5	26,1	0,72
amylo	bagaço	mani	água	40	72	69	2,5	25,3	0,17
amylo	bagaço	mani	água	40	72	68	5	18	0,22
amylo	bagaço	mani	água	60	48	69	2,5	19,05	0,11
amylo	bagaço	mani	água	60	48	68	2,5	19	0,13
amylo	bagaço	mani	água	80	96	69	2,5	15,2	0,28
amylo	bagaço	mani	água	80	96	69	7,5	12,9	0,24
amylo	bagaço	água	glicerol	40	96	56	10	14,55	0,18
amylo	bagaço	água	glicerol	40	96	58	10	10,35	0,18
amylo	bagaço	água	glicerol	60	72	58	2,5	13,2	0,14
amylo	bagaço	água	glicerol	60	72	58	2,5	12,2	0,13
amylo	bagaço	água	glicerol	80	48	58	2,5	11,3	0,13
amylo	bagaço	água	glicerol	80	48	58	2,5	10,55	0,31
amylo	bagaço	água	óleo	40	72	56	10	16,55	0,18
amylo	bagaço	água	óleo	40	72	58	10	10,35	0,33
amylo	bagaço	água	óleo	60	48	58	2,5	13,2	0,27
amylo	bagaço	água	óleo	60	48	58	2,5	12,2	0,37
amylo	bagaço	água	óleo	80	96	58	2,5	11,3	0,1
amylo	bagaço	água	óleo	80	96	58	2,5	10,55	0,12

amylo	bagaço	água	água	40	48	71	2,5	13,35	0,18
amylo	bagaço	água	água	40	48	71	5	10,5	0,21
amylo	bagaço	água	água	60	96	71	2,5	23,5	0,01
amylo	bagaço	água	água	60	96	71	7,5	30,6	0,07
amylo	bagaço	água	água	80	72	71	2,5	24,5	0,1
amylo	bagaço	água	água	80	72	71	2,5	15,4	0,18
