



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

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE *Bacillus*
velezensis UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATO**

Mestrando: Pedro Luiz Mota Aquino

**Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del
Bianchi (IBILCE/UNESP)**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte
Alegre (FEA/UNICAMP)**

São José do Rio Preto – SP

Dezembro 2011

PEDRO LUIZ DA MOTA E AQUINO

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE *Bacillus*
velezensis UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos (Área de Concentração: Engenharia de Alimentos)

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
(IBILCE/UNESP)

Co-Orientador Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(FEA/UNICAMP)

São José do Rio Preto
Dezembro – 2011



BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi (Orientador)

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

Profa. Dr^a Iracema de Oliveira Moraes

SUPLENTES:

Prof. Dr. Javier Telis Romero

Profa. Dr^a. Samara Ernandes

São José do Rio Preto – SP

Dezembro 2011

“Não é preciso ter olhos abertos para ver o sol, nem é preciso ter ouvidos afiados para ouvir o trovão. Para ser vitorioso você precisa ver o que não está visível.”

Sun Tzu

*Aos meus pais,
Jairo e Marta,
à minha amada companheira,
Amanda,
e ao meu querido irmão,
César
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu querido orientador Prof. Vanildo que confiou no meu potencial, me guiou e caminhou comigo no desenvolvimento trabalho.

A minha família, em especial meus pais e irmão, que foram bastante compreensivos com minha ausência por longos dois anos, pois sempre compartilharam comigo o sonho de alcançar mais este título.

A minha noiva Amanda por compartilhar desta luta.

A minha tia Alice pelo carinho e motivação.

A minha amiga Gisele por me auxiliar durante todo o projeto.

Ao Prof. Fernando e à Prof^ª.Iracema pela participação nesta banca.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do IBILCE/UNESP, pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório Deby, Sá, Vivi, Anelyse, Newton e Mauricio por toda ajuda oferecida e pelo companheirismo.

E a todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1.	SURFACTANTES E TENSOATIVOS.....	14
2.2.	BIOSURFACTANTE.....	17
2.2.1.	Surfactina.....	19
2.3.	MICROORGANISMO PRODUTOR DE BIOSURFACTANTE.....	20
2.3.1.	<i>Bacillus velezensis</i>	20
2.4.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	20
3.	OBJETIVOS.....	23
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1.	MICROORGANISMO.....	24
4.2.	MEIO DE CULTURA.....	24
4.2.1.	Pré-Fermentação.....	24
4.2.2.	Processo Fermentativo.....	25
4.2.2.1.	Produção em sacos plásticos.....	25
4.2.2.2.	Produção em biorreator.....	26
4.3.	EXTRAÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	27
4.4.	DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL E pH.....	28
4.4.1.	Determinação da tensão superficial por tensiômetro.....	28
4.4.2.	Determinação da tensão superficial baseada pela lei de Tates.....	28
4.4.3.	Determinação de pH.....	29
4.5.	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (E24).....	29
4.6.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE.....	29
4.7.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).....	29
4.8.	EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE O ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO ...	30
5.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
6.	RESULTADOS.....	34
6.1.	TESTES PRELIMINARES.....	34
6.1.1.	Testes de Necessidade de Pré-Inóculo.....	34

6.1.1.1.	Bagaço de Mandioca	34
6.1.2.	Análise comparativa da tensão superficial de biossurfactantes produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus velezensis</i> por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.	40
6.1.3.	Teste de confiabilidade da análise de tensão superficial pela lei de Tates.	41
6.1.4.	Efeito do congelamento no índice de emulsificação de biossurfactantes produzido por fermentação em estado sólido por <i>Bacillus velezensis</i>	42
6.2.	ANÁLISES DE REPRODUTIBILIDADE DAS FERMENTAÇÕES	43
6.2.1.	Tensão superficial.....	43
6.2.2.	E24, E48, E72 e E96.....	44
6.2.3.	Atividade Emulsificante	48
6.2.4.	CMC	49
6.2.5.	pH	51
6.3.	SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE CULTIVO	52
6.3.1.	Análise de tensão superficial	52
6.3.2.	Análise de Índice de Emulsificação.....	54
6.3.3.	Análise de CMC	59
6.3.4.	Análise de pH	62
6.3.5.	Análise de atividade emulsificante	63
6.4.	PRODUÇÃO EM BIORREATOR DE BANCADA	64
6.4.1.	Biorreator de coluna estático	64
6.4.2.	Biorreator de tambor rotativo	69
7.	CONCLUSÕES	74
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Exemplo de molécula anfipática (ESMERALDO, 2010)	14
FIGURA 2 - Esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido (BUENO, 2008)	16
FIGURA 3 - Organização das moléculas de tensoativos (BUENO, 2008)	16
FIGURA 4 - Estrutura da principal isoforma da surfactina (PEYPOUX <i>et al.</i> , 1999)	19
FIGURA 5 - Sacos plásticos utilizados para fermentação	25
FIGURA 6 - Biorreator Utilizado.....	26
FIGURA 7 – Biorreator de tambor rotativo	27
FIGURA 8 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 100% utilizando bagaço de mandioca como substrato (mN/m ²)	35
FIGURA 9 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 80% utilizando bagaço de mandioca como substrato	35
FIGURA 10 - Índice de Emulsificação x Tempo na umidade de 100%, utilizando bagaço de mandioca como substrato	36
FIGURA 11 - Índice de Emulsificação x Tempo na umidade de 80%, utilizando bagaço de mandioca como substrato	36
FIGURA 12 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 100%	37
FIGURA 13 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 80%	38
FIGURA 14- Índice de Emulsificação x Tempo com umidade de 100%.	39
FIGURA 15 - Índice de Emulsificação x Tempo com umidades de 80%.....	39
FIGURA 16 - Determinação da tensão superficial das fermentações com <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus velezensis</i> com umidade de 80 e 100%.....	40
FIGURA 17 - Tensão Superficial da glicerina medida pelo método de peso de gotas em comparação pelo descrito em literatura.	41
FIGURA 18 - Índice de emulsificação	42
FIGURA 19 - Comparação entre as diferentes fermentações da tensão superficial	43
FIGURA 20 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E24	44
FIGURA 21 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E48	45

FIGURA 22 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E72	46
FIGURA 23 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E96	47
FIGURA 24 - Comparação entre as Atividades Emulsificantes obtidas.....	48
FIGURA 25 - Comparação entre os CMC com diluição 1p/10.	49
FIGURA 26 - Comparação entre os CMC com diluição 1p/100.	50
FIGURA 27 - Comparação entre os pH	51
FIGURA 28 - Tensão superficial obtida a partir de diferentes meios de cultura (C= crueira; M = farelo de mandioca; T=farelo de trigo) (tensão superficial da água = 72 mN/m ²).....	52
FIGURA 29 - Tensão superficial em fermentações contendo farelo de trigo como substrato.	53
FIGURA 30- Índice de emulsificação E24 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crueira e farelo de trigo)	54
FIGURA 31 - Índice de emulsificação E48 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crueira e farelo de trigo)	55
FIGURA 32 - Índice de emulsificação E72 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crueira e farelo de trigo)	55
FIGURA 33 – Índice de emulsificação E96 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crueira e farelo de trigo)	56
FIGURA 34 Índice de emulsificação E24 para análises contendo farelo de trigo como substrato.....	57
FIGURA 35- Resultados para índice de emulsificação E48 para análises contendo farelo de trigo como substrato.	57
FIGURA 36 - Resultados para índice de emulsificação E72 para análises contendo farelo de trigo como substrato.	58
FIGURA 37 - Resultados para índice de emulsificação E48 para análises contendo farelo de trigo como substrato.	58
FIGURA 38– Concentração micelar crítica com diluição 1 p/ 10.	59
FIGURA 39 - Concentração micelar crítica com diluição 1 p/ 10.	60
FIGURA 40 - Concentração micelar crítica com diluição 1 p/ 10 analisando as condições diversas.	60
FIGURA 41 - Concentração micelar crítica diluição 1 p/ 100 analisando as condições diversas.	61
FIGURA 42 - Variação de pH nas diversas fermentações	62

FIGURA 43 - Variação de pH n processo com farelo de trigo como substrato.....	63
FIGURA 44 - Índice de emulsificação variando nas diversas condições de fermentação.	64
FIGURA 45 – Esquema do biorreator utilizado.....	65
FIGURA – 46 Tensão superficial para a fermentação conduzida no biorreator de coluna estático com aeração forçada.....	65
FIGURA 47– Frascos para medir índice de emulsificação	66
FIGURA 48– Índice de emulsificação medidos em 24, 48, 72 e 96 horas	66
FIGURA 49– CMC medidos em diluições de 1p/10 (v/v) e 1p/100 (v/v)	67
FIGURA 50– pH medido após a fermentação	67
FIGURA 51 - Atividade emulsificante do biossurfactante medida em diluição 1p/100 (v/v) .	68
FIGURA 52 - Comportamento da temperatura durante o processo de fermentação.....	68
FIGURA 53 – Tensão superficial para a fermentação conduzida no biorreator de coluna estático com aeração forçada.....	69
FIGURA 54 – Frascos para medir índice de emulsificação	70
FIGURA 55– Índice de emulsificação medidos em 24, 48, 72 e 96 horas	70
FIGURA 56 – CMC medidos em diluições de 1p/10 v/v e 1p/100 (v/v).....	71
FIGURA 57 – pH medido antes e após o processo fermentativo.....	72
FIGURA 58- Atividade emulsificante do biossurfactante medida em diluição 1p/100 (v/v) ..	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos (DESAI; BANAT, 1997).....	18
Tabela 2 - Planejamento experimental da ordem de obtenção dos dados	32
Tabela 3 - ANOVA Tensão superficial	43
Tabela 4 - ANOVA E24	44
Tabela 5- ANOVA E48	45
Tabela 6 - ANOVA E72	46
Tabela 7 - ANOVA E96	47
Tabela 8 - ANOVA Atividade Emulsificante.....	48
Tabela 9 - ANOVA CMC 1p/10	49
Tabela 10 - ANOVA CMC 1p/100	50
Tabela 11- ANOVA pH.....	51
Tabela 12 - Testes envolvendo o substrato farelo de trigo	53

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são agentes de superfície ativa sintetizados por várias espécies de microrganismos, sendo as bactérias e as leveduras os principais produtores. A molécula do biossurfactante é anfipática, ou seja, é formada por uma parte hidrofílica, solúvel em água, e uma parte hidrofóbica, solúvel em solvente orgânico. Tal composto é sintetizado durante o crescimento ou na fase estacionária do desenvolvimento do microrganismo em meios de cultura contendo fontes de carbono. A produção pode ser automática ou induzida através da presença de compostos lipídicos, como a glicerina ou o óleo de soja, por exemplo, e também por variações de aeração, pH, temperatura e agitação. O processo de produção do biossurfactante contribui para a dissolução em água de compostos hidrofóbicos, podendo ser empregado no tratamento de efluentes industriais e em solos contaminados por derramamento de petróleo e seus derivados.

Existe vasta possibilidade de aplicação em alimentos, na agricultura, na indústria cosmética e farmacêutica, devido principalmente à baixa toxicidade e biodegradabilidade.

Neste trabalho, a bactéria *Bacillus velezensis* foi utilizada na produção de biossurfactante. As variáveis substrato (farelo de trigo, farelo de mandioca e crueira), agentes umidificantes (água residuária de indústria de laticínios, manipueira e solução-tampão) e umidade (40%, 60%, 80% e 100%), com pH inicial da fermentação de 6,8 e temperatura de incubação de 37°C, foram avaliadas em relação à redução de tensão superficial, atividade emulsificante, índice de emulsificação, concentração micelar crítica e quanto ao poder de manutenção do pH inicial. Os experimentos foram conduzidos em sacos plásticos por fermentação em estado sólido em câmara de DBO e posteriormente em dois tipos de biorreatores (tipo coluna e tambor rotativo) em escala de bancada, objetivando selecionar uma condição ótima dentro das apresentadas à produção do biossurfactante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SURFACTANTES E TENSOATIVOS

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em vários setores de diferentes tipos de indústrias onde encontram aplicação em uma larga variedade de processos industriais. São, por definição, moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), podendo ser obtidas sinteticamente, através de reações químicas, ou naturalmente, através de microrganismos específicos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; NITSCHKE; PASTORE, 2003).

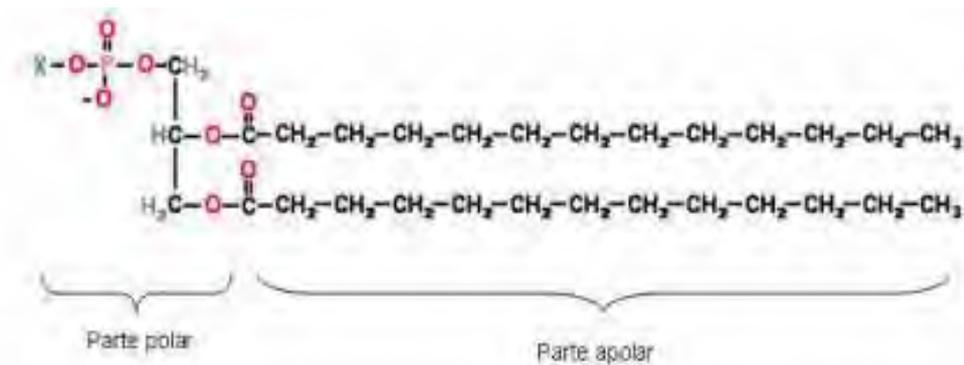


FIGURA 1 - Exemplo de molécula anfipática (ESMERALDO, 2010)

Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão “surface active agent”, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Em outras palavras, surfactante é um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido (JÖNSSON et al., 1998; WATERS; PORTER, 1991).

A grande maioria dos surfactantes, disponíveis comercialmente, é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (DESAI; BANAT, 1997).

Os surfactantes são produtos muito utilizados nas indústrias químicas, aparecendo em uma série de segmentos, tais como produtos automotivos, farmacêuticos, de limpeza e em processos de refino de petróleo. Nos anos 90, houve uma grande expansão na aplicação de surfactantes nas áreas de tecnologia, impressão eletrônica, gravação magnética, microeletrônica, biotecnologia e pesquisa (ROSEN et al., 2001).

As moléculas de surfactantes possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e são produzidas química ou biologicamente. Os surfactantes reduzem a tensão superficial, formando microemulsões, promovendo a dispersão de hidrocarbonetos nas soluções aquosas. Tal característica é comercialmente interessante para a produção de detergentes, emulsificantes e espumas para as indústrias de alimentos, cosmética, farmacêutica e química (BUENO, 2008).

A tensão superficial surge nos líquidos como resultado do desequilíbrio entre as forças agindo sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da solução. As moléculas de qualquer líquido localizadas na interfase líquido-ar realizam um número menor de interações intermoleculares comparadas com as moléculas que se encontram no interior do líquido (Figura 2). A força resultante, que atrai as moléculas da superfície de um líquido para o seu interior, torna-se o principal obstáculo para a formação de bolhas, gotas e a nucleação de cristais em líquidos. Como estas forças de coesão tendem a diminuir a área superficial ocupada pelo líquido, observa-se freqüentemente gotas adotarem a forma esférica. A esta força que atua na superfície dos líquidos dá-se o nome de tensão superficial e, geralmente, é quantificada determinando-se o trabalho necessário para aumentar a área superficial. Quanto menor a tensão superficial maior a facilidade para o líquido se espalhar (ADAMSON; GAST, 1997).

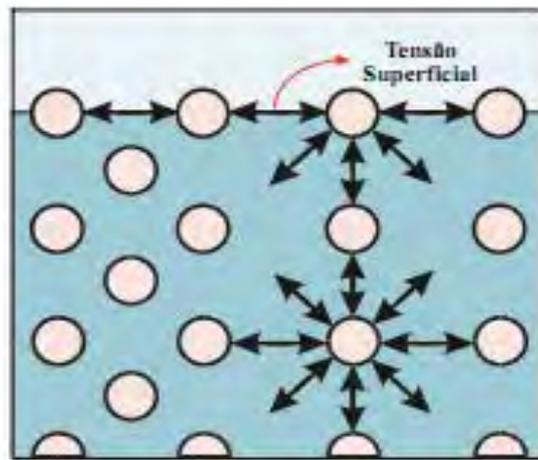


FIGURA 2 - Esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido (BUENO, 2008)

Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, formam-se em baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC) (Figura 3), sendo esta uma importante característica de um surfactante. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT, 2000).

Assim, vários compostos com estas propriedades tensoativas podem ser sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e também nos organismos humanos, como sais biliares, sendo considerados surfactantes naturais (BOGNOLO, 1999).

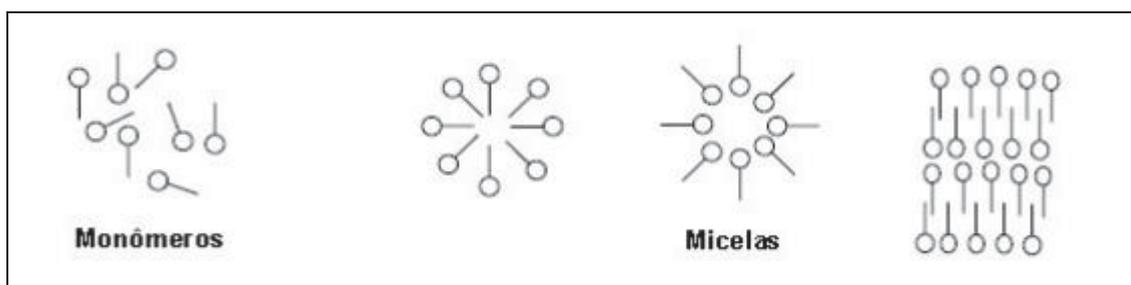


FIGURA 3 - Organização das moléculas de tensoativos (BUENO, 2008)

Porém, em países industrializados, existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, devido à necessidade de produtos mais brandos e produzidos por matéria-prima renovável, e também pela necessidade da substituição de compostos não biodegradáveis (alquil, benzenos e ramificados) (BOGNOLO, 1999).

2.2. BIOSSURFACTANTE

Alguns compostos de origem microbiana exibem propriedades surfactantes (tensoativas) e são denominados biossurfactantes, os quais são subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras. São classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos (Tabela 1) (OLIVEIRA, 2010).

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, porém, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores combinado com novas legislações de controle de meio-ambiente levaram à procura por surfactantes naturais, como alternativa aos produtos existentes (DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, poder de produção a partir de substratos renováveis, já que os biossurfactantes são compostos que não são derivados do petróleo, e capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas. Porém, ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos, principalmente devido ao seu alto custo (COLLA; COSTA, 2003).

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos (DESAI; BANAT, 1997).

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
GLICOLIPÍDEOS	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ramnolipídeos ➤ soforolipídeos ➤ trealolipídeos 	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i></p> <p><i>Rhodococcus erythropolis,</i></p> <p><i>Mycobacterium sp</i></p>
LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNA	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ peptídeo-lípido ➤ viscosina ➤ serrawetina ➤ surfactina ➤ subtilisina ➤ gramicidina ➤ polimixina 	<p><i>Bacillus licheniformis</i></p> <p><i>Pseudomonas fluorescens</i></p> <p><i>Serratia marcescens</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Bacillus brevis</i></p> <p><i>Bacillus polymyxa</i></p>
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ ácidos graxos ➤ lipídeos neutros ➤ fosfolipídeos 	<p><i>Corynebacterium lepus</i></p> <p><i>Nocardia erythropolis</i></p> <p><i>Thiobacillus thiooxidans</i></p>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ emulsan ➤ biodispersan ➤ liposan ➤ carboidrato-lípido-proteína ➤ manana-lípido-proteína 	<p><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></p> <p><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></p> <p><i>Candida lipolytica</i></p> <p><i>Pseudomonas fluorescens</i></p> <p><i>Candida tropicalis</i></p>
SURFACTANTES PARTICULADOS	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ vesículas ➤ células 	<p><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></p> <p><i>Várias bactérias</i></p>

2.2.1. Surfactina

A surfactina é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m² (ARIMA et al., 1968; BOGNOLO, 1999; COOPER et al., 1981) em concentrações menores de 20 µM (PEYPOUX et al., 1999), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m² (LANG, 2002; COOPER et al., 1981).

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* e sua estrutura geral, apresentada na Figura 4, é a 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 (LANG, 2002; KOWALL et al., 1998; KLUGE et al., 1988). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3-hidroxi-13-metil-tetradecanóico (KOWALL et al., 1998; KLUGE et al., 1988) ligado por ligação lactona, tal como os demais (PEYPOUX et al., 1999).

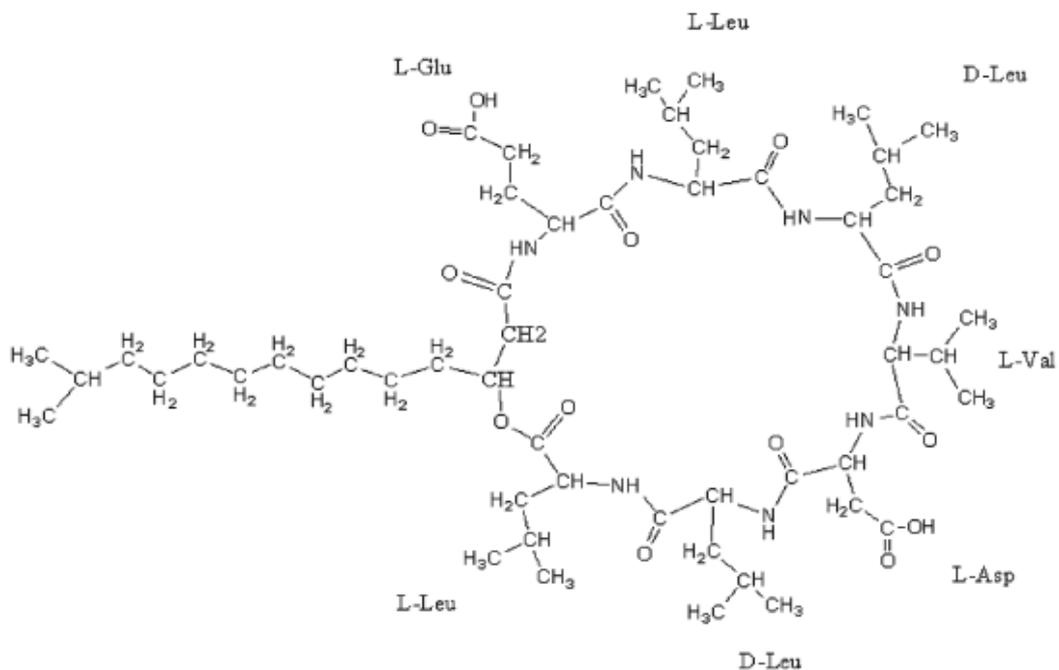


FIGURA 4 - Estrutura da principal isoforma da surfactina (PEYPOUX *et al.*, 1999)

Quando é comparada a outros biossurfactantes (COOPER et al., 1981; HAFENBURG et al., 2003) e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA) (KIM et al., 1997), possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta menores valores de concentração micelar crítica (CMC) (COOPER et al., 1981; KIM et al., 1997).

2.3. MICRORGANISMO PRODUTOR DE BIOSSURFACTANTE

2.3.1. *Bacillus velezensis*

A bactéria *Bacillus velezensis* é uma espécie do gênero *Bacillus* e inclui duas cepas que foram isoladas durante um programa de pesquisas que visava descobrir novas cepas de bactérias capazes de sintetizar novos lipopeptídeos com atividade surfactante e antimicrobiana (RUIZ-GARCIA et al., 2005).

Para testar a qualidade do biossurfactante produzido por este microorganismo, foram feitos alguns testes a fim de selecionar linhagens como potenciais produtoras de surfactantes utilizando-se a metodologia proposta por Bodour; Miller-Maier (1998).

A utilização da bactéria visa sintetizar, com rendimentos substanciais, lipopeptídeos relacionados com a família da surfactina, o mais ativo grupo de biossurfactante relatados até agora. Estes produtos podem também exercer atividade antimicrobiana (MONTEIRO, 2002).

2.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos.

Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, em perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor (PONTES, 2009).

Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG *et al.*, 2003).

A bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FSS) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (RAIMBAULT, 1998, DEL BIANCHI; CAPALBO; MORAES, 2001).

A fermentação em estado sólido, fermentação semi-sólida ou fermentação em meio semi-sólido, aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos com pouca presença de água disponível. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998 DEL BIANCHI; CAPALBO; MORAES,2001).

A FSS também apresenta as seguintes características:

- A fase sólida pode atuar como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas.

- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio em pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração em suas partículas individuais.
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais.
- O meio apresenta alta heterogeneidade, porém técnicas de agitação devem garantir que os substratos estejam completamente acessíveis ao microrganismo.

Este trabalho tem o propósito de levantar dados sobre a produção e aplicação da surfactina, o principal surfactante produzido por linhagens de *Bacillus velezensis*. Apesar de ser um biosurfactante muito efetivo, poucos estudos foram realizados a respeito de suas aplicações. Além disso, suas características químicas e propriedades funcionais permitem evidenciar o grande potencial dessa substância para aplicação em diversos segmentos industriais.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar biossurfactantes utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 3.2.1 Avaliar a produção de biossurfactantes utilizando *Bacillus velezensis* a partir de substratos distintos;
- 3.2.2 Determinar as melhores condições para a produção dos biossurfactantes;
- 3.2.3 Avaliar a utilização de efluentes agroindustriais como substrato e umidificador na produção de biossurfactantes;
- 3.2.4 Avaliar o poder de emulsificação do biossurfactante
- 3.2.5 Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido frente a condições de pH e temperatura.
- 3.2.6 Avaliar os melhores resultados de produção de surfactina utilizando um reator de coluna e um reator rotativo de escala de bancada avaliando temperatura e umidade de produção

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

O microrganismo *Bacillus velezensis*, proveniente do Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, foi mantido em Agar nutriente. A renovação das células foi feita por repique das mesmas no mesmo meio e levadas à estufa a 37°C para incubação por 24 h. Após incubação, esta cultura foi mantida sob refrigeração ou utilizada como inóculo para as fermentações.

4.2. MEIO DE CULTURA

Foram utilizados substratos para a fermentação, a saber: (i) farelo de trigo; (ii) bagaço de mandioca; (iii) crueira. Os meios de cultura utilizados foram umedecidos até uma umidade de aproximadamente 40%, 60%, 80% e 100% com (i) solução tampão fosfato (ii) água residuária de laticínios e (iii) manipueira, utilizando glicerol (20% m/m) como indutor da produção e pH ajustado para 6,8. O meio de fermentação foi autoclavado a 121°C por 15 min.

4.2.1. Pré-Fermentação:

A pré-fermentação foi realizada em dois meios, a saber:

- Pré-fermentação em estado sólido: O processo ocorre em farelo de trigo umedecido com solução tampão fosfato por 24 horas em estufa com temperatura controlada de 37°C.

- Pré-fermentação em estado líquido: A pré-fermentação em meio líquido ocorre em caldo nutriente por 24 horas em estufa com temperatura controlada de 37°C.
- Adição direta: o microrganismo é transferido diretamente do meio de manutenção para o meio de cultura, utilizando 2 ml de suspensão de células em água destilada estéril para a inoculação do meio (10g).

4.2.2. *Processo Fermentativo*

4.2.2.1. Produção em sacos plásticos.

Do caldo da pré-fermentação, foram transferidos 2 ml da suspensão celular para saquinhos plásticos com tamanhos de 10 cm de largura por 20 cm de comprimento, contendo 10 g dos meios de crescimento, acrescidos de 2 ml de glicerol e de agentes umidificantes nas proporções descritas anteriormente (Figura 5) e a cultura foi incubada por 96 horas a 37 °C.



FIGURA 5 - Sacos plásticos utilizados para fermentação

4.2.2.2. Produção em biorreator

4.2.2.2.1. *Biorreator de coluna estático*

Os melhores resultados de produção de biossurfactante foram utilizados na produção em um biorreator de coluna de escala de bancada com volume de 1 litro (Figura 6) avaliando temperatura e umidade ótima de produção.



FIGURA 6 - Biorreator Utilizado

O mecanismo completo para o biorreator consiste em um reator de vidro com camisa com o objetivo de efetuar o controle de temperatura e com abertura inferior para aeração, uma bomba peristáltica para circulação de água pela camisa do reator e um banho-maria para fornecimento de água aquecida. Foi utilizado um termopar para monitoramento de temperatura durante todo o processo e injeção inferior de ar para aeração forçada.

4.2.2.2. *Biorreator de tambor rotativo*

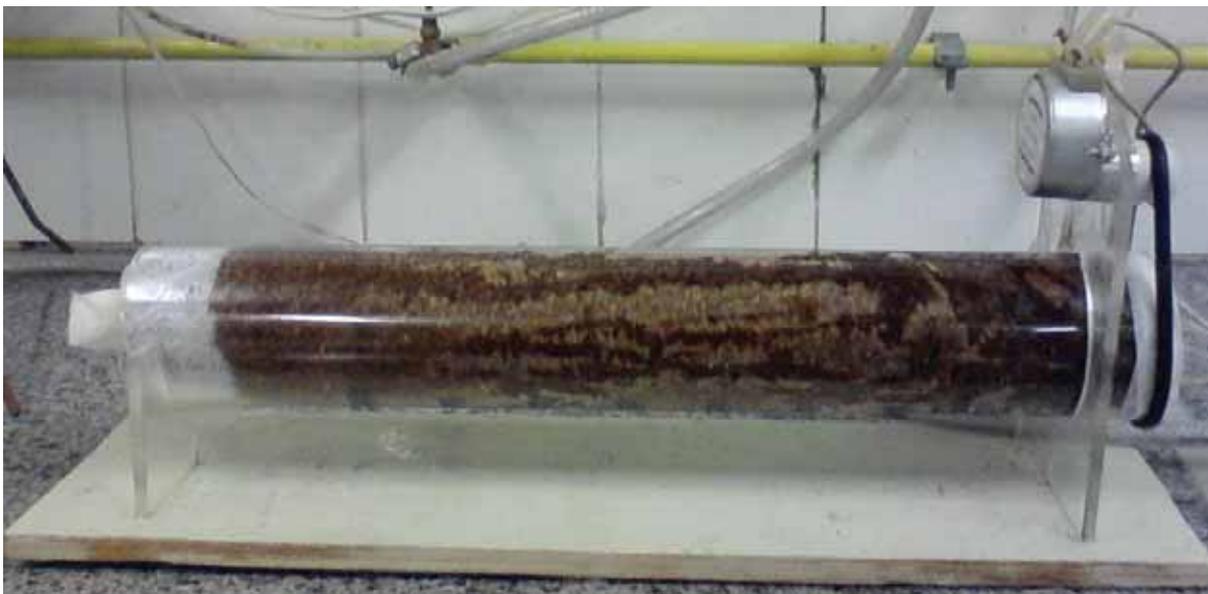


FIGURA 7 – Biorreator de tambor rotativo

Consiste em um biorreator de vidro (Figura 7) com tambor de 1 litro preso em um suporte de acrílico com uma roldana em uma das pontas preso por uma correia de borracha a um motor elétrico de 127 V com frequência de 60 Hz e 4 W de potência com giro de 40 rpm.

Este sistema pretendeu conferir ao substrato maior homogeneização e maior aeração proporcionando ao microrganismo melhores condições para produção do biossurfactante.

4.3. EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A extração do biossurfactante do meio fermentativo foi realizada com adição de 100 ml de água aquecida a 90 °C e/ou com água a temperatura ambiente para cada 10 g de meio. Após a adição da água, a amostra foi submetida à agitação em Shaker a 200 rpm por 60 min,. A seguir, a amostra foi filtrada a vácuo, depois centrifugada à uma temperatura de 4°C e rotação de 10.000 RPM por 10 minutos, e o sobrenadante utilizado para a avaliação da atividade emulsificante.

4.4. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL E pH

4.4.1. Determinação da tensão superficial por tensiômetro

A determinação de produção de biossurfactante foi realizada medindo-se as tensões iniciais e finais do caldo de cultivo livre de células, utilizando o tensiômetro segundo o método do anel de De Nöuy.

4.4.2. Determinação da tensão superficial baseada pela lei de Tates

Usando um béquer previamente pesado, contou-se um determinado número de gotas de um líquido e determinou-se o peso das mesmas. Assim, tem-se pela lei de Tates

$$p = 2\pi R\gamma$$

Repetindo-se a operação para um líquido de tensão superficial conhecida tem-se

$$p' = 2\pi R\gamma'$$

Dividindo esta equação pela equação anterior tem-se

$$\frac{p'}{p} = \frac{\gamma'}{\gamma} \quad \text{ou} \quad \frac{m'.g}{m.g} = \frac{\gamma'}{\gamma} \rightarrow \frac{m'.g}{m.g} = \frac{\gamma'}{\gamma} \rightarrow \frac{m'}{m} = \frac{\gamma'}{\gamma} \rightarrow \left[\gamma' = \frac{m'}{m} \cdot \gamma \right]$$

Onde:

γ = tensão superficial do líquido

m = massa do líquido

m' = massa do líquido conhecido

γ' = tensão superficial do líquido conhecido

4.4.3. Determinação de pH

O pH do meio de cultivo foi analisado utilizando-se um pHmetro, marca Marconi.

4.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (E24)

O Índice de emulsificação foi determinado através da adição do óleo de soja ao extrato (2mL de cada) em tubos de ensaio, seguida por agitação em vórtex em alta velocidade durante 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado através da fórmula:

$$E24 = \left(\frac{\text{altura.da.camada.de.emulsão}}{\text{altura.total}} \right) \cdot 100$$

4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE

A atividade emulsificante foi determinada através da adição do óleo de soja ao caldo de cultivo livre de células (2 ml de cada) em tubos de ensaio, seguida de agitação em vórtex durante 2 min, realizando posteriormente a leitura óptica em espectrofotômetro a 610nm.

4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A determinação da CMC foi realizada pela medida de tensão superficial do sobrenadante (livre de células) diluindo-o sucessivamente (volumes iguais de água) até o valor da tensão se aproximar ao valor da água.

Foram medidas a tensão superficial (TS), a diluição micelar crítica 1/10 (CMC 1p/10) e 1/100 (CMC 1p/100) (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; COSTA, 2005).

4.8. EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE O ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

As amostras foram separadas em dois lotes, sendo que no primeiro foram efetuadas as análises do índice de emulsificação assim que terminava a fermentação e no segundo as amostras foram mantidas sob congelamento à -2°C por 60 dias.

5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Definidos os fatores a serem trabalhados e seus respectivos níveis, foi realizado o planejamento fatorial a fim de organizar a ordem em que os dados deveriam ser adquiridos (Tabela 2).

- Meio de cultura;
 - Farelo de Trigo
 - Bagaço de Mandioca
 - Cruera
- Agente umidificante;
 - Solução Tampão Fosfato
 - Manipueira Pura
 - Água residuária de laticínios pura
- Umidade
 - 40%
 - 60%
 - 80%
 - 100%

Tabela 2 - Planejamento experimental da ordem de obtenção dos dados

Obtenção de dados	Teste	Substrato	Agente umidificante	Umidade
20	1	Crueira	Solução Tampão	60%
21	2	Crueira	Solução Tampão	80%
18	3	Bagaço de Mandioca	Manipueira	80%
19	4	Crueira	Solução Tampão	40%
14	5	Bagaço de Mandioca	Água de Laticínio	60%
8	6	Farelo de Trigo	Manipueira	60%
10	7	Bagaço de Mandioca	Solução Tampão	40%
26	8	Crueira	Manipueira	60%
15	9	Bagaço de Mandioca	Água de Laticínio	80%
2	10	Farelo de Trigo	Solução Tampão	60%
9	11	Farelo de Trigo	Manipueira	80%
24	12	Crueira	Água de Laticínio	80%
6	13	Farelo de Trigo	Água de Laticínio	80%
11	14	Bagaço de Mandioca	Solução Tampão	60%
12	15	Bagaço de Mandioca	Solução Tampão	80%
25	16	Crueira	Manipueira	40%
5	17	Farelo de Trigo	Água de Laticínio	60%
4	18	Farelo de Trigo	Água de Laticínio	40%
1	19	Farelo de Trigo	Solução Tampão	40%
17	20	Bagaço de Mandioca	Manipueira	60%
3	21	Farelo de Trigo	Solução Tampão	80%
23	22	Crueira	Água de Laticínio	60%
16	23	Bagaço de Mandioca	Manipueira	40%
7	24	Farelo de Trigo	Manipueira	40%
27	25	Crueira	Manipueira	80%
13	26	Bagaço de Mandioca	Água de Laticínio	40%
22	27	Crueira	Água de Laticínio	40%
46	28	Crueira	Solução Tampão	40%
54	29	Crueira	Manipueira	80%
42	30	Bagaço de Mandioca	Água de Laticínio	80%
30	31	Farelo de Trigo	Solução Tampão	80%

Tabela 2 (Cont...) - Planejamento experimental da ordem de obtenção dos dados.

Obtenção de dados	Teste	Substrato	Agente umidificante	Umidade
28	32	Farelo de Trigo	Solução Tampão	40%
37	33	Bagaço de Mandioca	Solução Tampão	40%
51	34	Crueira	Água de Laticínio	80%
53	35	Crueira	Manipueira	60%
48	36	Crueira	Solução Tampão	80%
32	37	Farelo de Trigo	Água de Laticínio	60%
36	38	Farelo de Trigo	Manipueira	80%
43	39	Bagaço de Mandioca	Manipueira	40%
39	40	Bagaço de Mandioca	Solução Tampão	80%
29	41	Farelo de Trigo	Solução Tampão	60%
38	42	Bagaço de Mandioca	Solução Tampão	60%
33	43	Farelo de Trigo	Água de Laticínio	80%
41	44	Bagaço de Mandioca	Água de Laticínio	60%
31	45	Farelo de Trigo	Água de Laticínio	40%
34	46	Farelo de Trigo	Manipueira	40%
45	47	Bagaço de Mandioca	Manipueira	80%
47	48	Crueira	Solução Tampão	60%
40	49	Bagaço de Mandioca	Água de Laticínio	40%
44	50	Bagaço de Mandioca	Manipueira	60%
49	51	Crueira	Água de Laticínio	40%
50	52	Crueira	Água de Laticínio	60%
35	53	Farelo de Trigo	Manipueira	60%
52	54	Crueira	Manipueira	40%

6. RESULTADOS

6.1. TESTES PRELIMINARES

Foram feitos testes preliminares, a fim de se obter uma serie de respostas para condições de inoculação, estocagem, determinação de tensão superficial e já iniciar o estudo da umidade extrapolando os limites pré-estabelecidos a fim de se saber qual limite poderia ser utilizado.

Também foram feitas análises de produção do biossurfactante com o microrganismo *Bacillus subtilis*, nas mesmas condições, que já é amplamente estudado para produção de biossurfactantes, para comparar a produção entre os dois microrganismos.

6.1.1. Testes de Necessidade de Pré-Inóculo

Foi verificada se haveria a necessidade da pré-fermentação a fim de se obter uma resposta a esta questão. As fermentações que necessitassem de pré-fermentação levariam 48 horas para o preparo desse inóculo (24 horas para crescimento no tubo de ensaio e 24 horas em meio liquido ou farelo de trigo), enquanto que, se feita a adição direta da suspensão do microrganismo em água estéril, retirada do crescimento em meio ágar nutriente, levariam 24 horas para serem preparados (apenas as 24 horas do preparo dos tubos de ensaio), economizando assim 24 horas no tempo total de preparo das amostras.

6.1.1.1. Bagaço de Mandioca

Inicialmente, foi feito o teste utilizando o bagaço de mandioca como substrato, e utilizando umidades de 80% e 100%.

De acordo com as Figuras 8 e 9, observa-se que ocorreu uma pequena redução na tensão superficial em todas as fermentações, quando comparadas com a tensão superficial da água (72,8 mN/m²). Para as análises em que se utilizou o pré-inóculo, não houve diferença significativa na redução da tensão superficial em relação às demais.

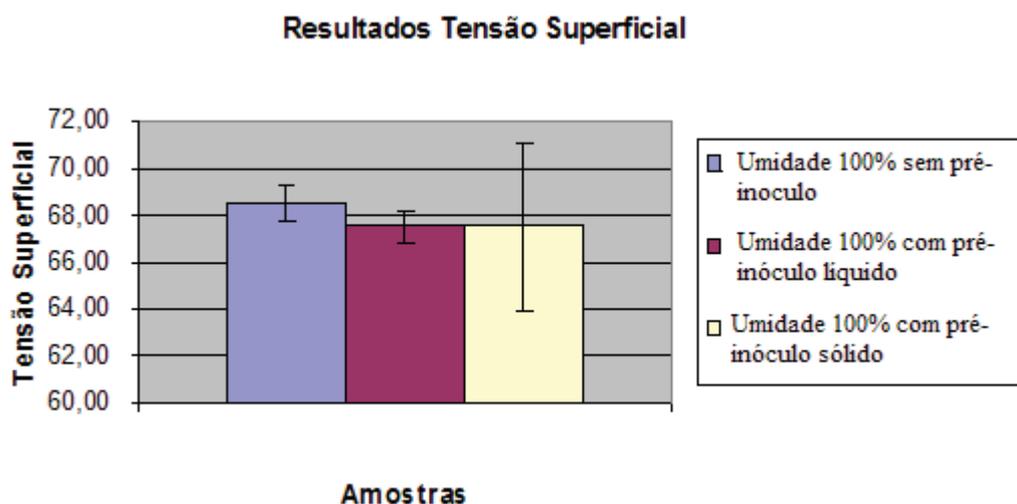


FIGURA 8 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 100% utilizando bagaço de mandioca como substrato (mN/m²)

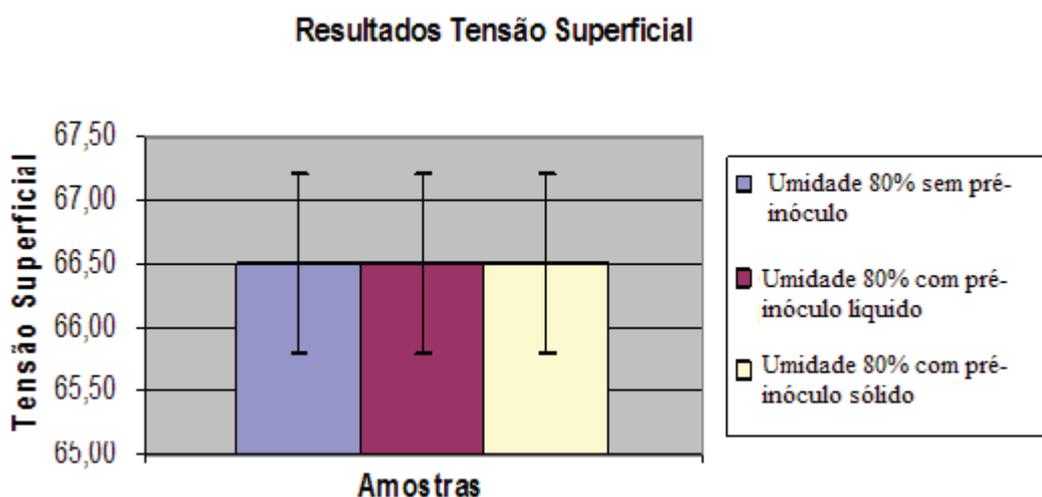


FIGURA 9 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 80% utilizando bagaço de mandioca como substrato

Quanto ao índice de emulsificação, as amostras com 100% de umidade não obtiveram bons resultados, tanto para as com pré-inóculo líquido quanto para as sem pré-inóculo e principalmente no pré-inóculo sólido, onde se obteve o pior resultado (Figura 10).

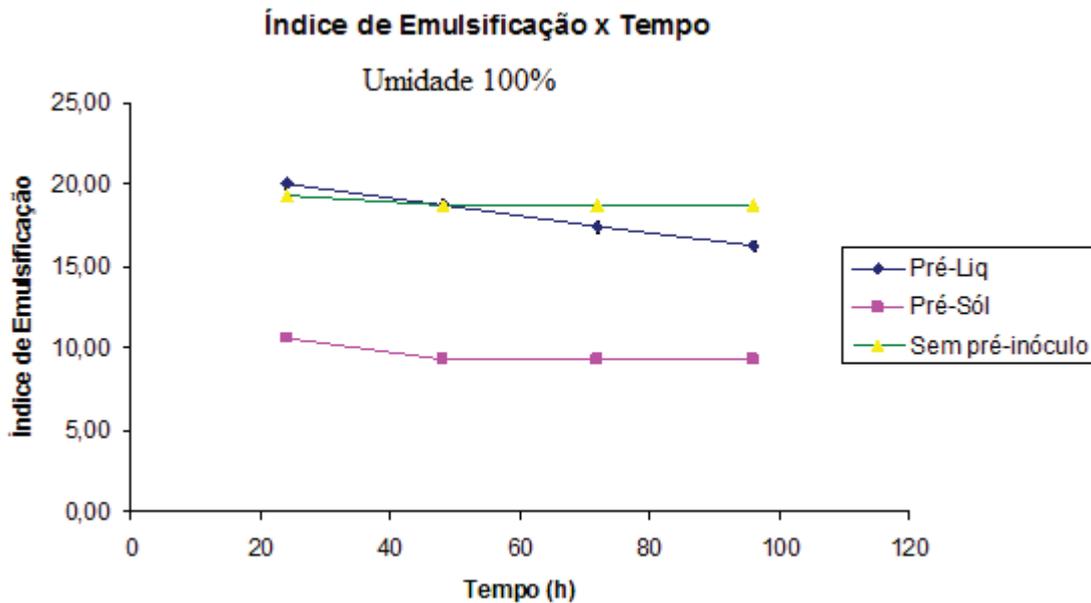


FIGURA 10 - Índice de Emulsificação x Tempo na umidade de 100%, utilizando bagaço de mandioca como substrato

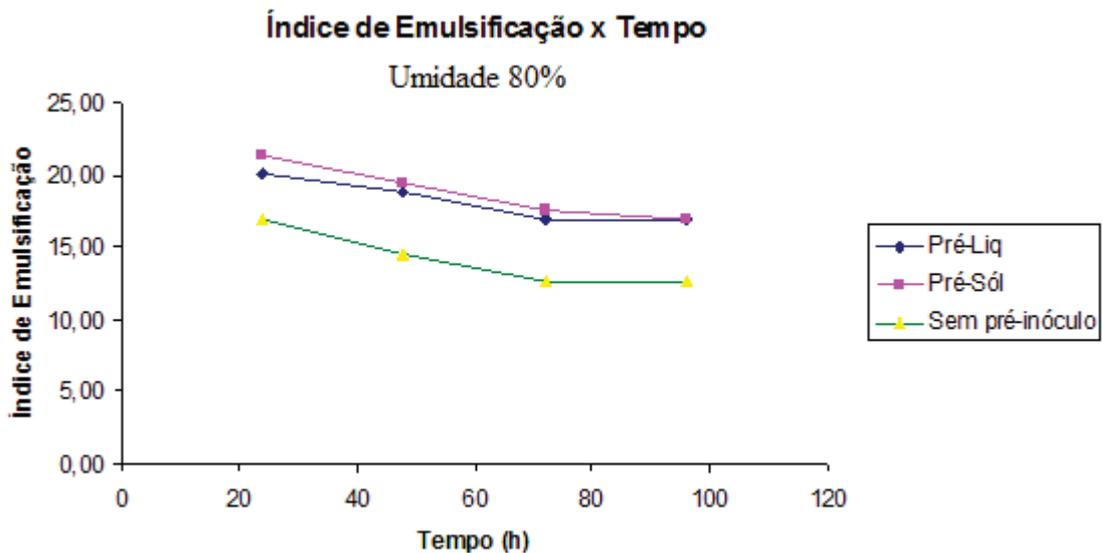


FIGURA 11 - Índice de Emulsificação x Tempo na umidade de 80%, utilizando bagaço de mandioca como substrato

Já para a umidade de 80%, pode-se observar um melhor desempenho nas amostras que utilizaram pré-inóculo em relação àquelas em que não houve preparo do pré-inóculo (Figura 11).

6.1.1.2. Farelo de Trigo

Foram feitos testes também com o farelo de trigo para verificar se foi realmente o pré-inóculo que não interferiu nos resultados finais ou o substrato utilizado. Assim, para a confirmação da hipótese, variou-se o meio de cultivo.

De acordo com os resultados obtidos de tensão superficial utilizando farelo de trigo como substrato, nota-se que houve reduções nas tensões superficiais em todos os casos (Figuras 12 e 13).

Observou-se que, para as amostras em que não se utilizou o pré-inóculo previamente fermentado, houve uma maior redução da tensão superficial em relação às demais.

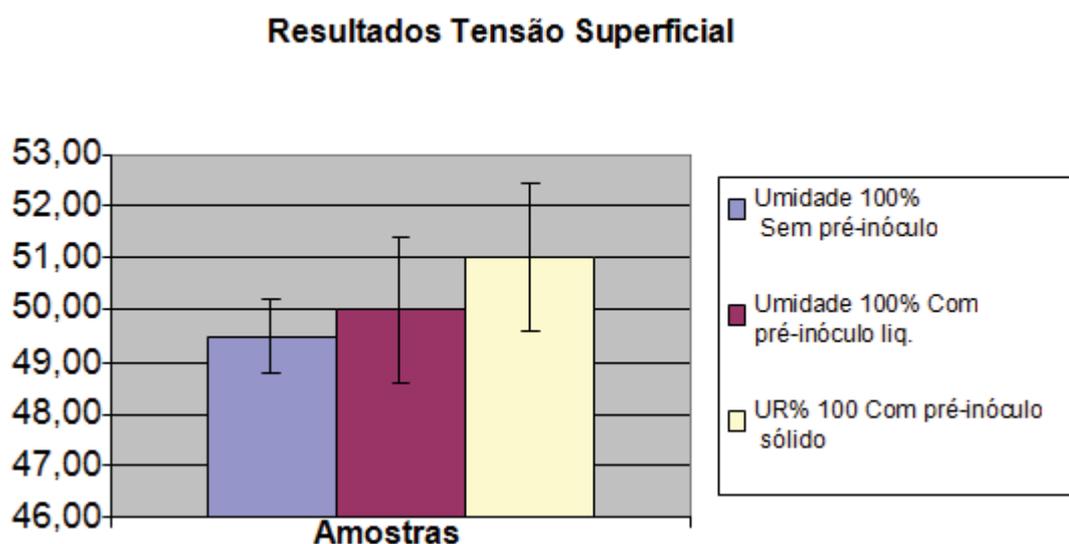


FIGURA 12 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 100%

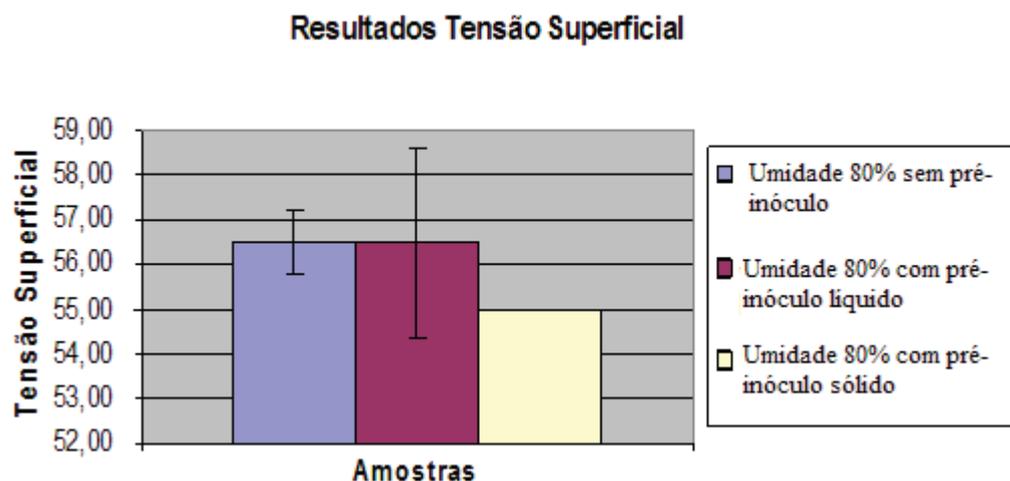


FIGURA 13 - Resultados de Tensão Superficial para a umidade de 80%

Nas análises com umidade de 80% (Figura 14), observou-se que o índice de emulsificação da amostra com o pré-inóculo sólido foi o menor encontrado, enquanto que as demais amostras obtiveram valores bem próximos.

Assim, para umidade de 80%, pode-se observar um melhor desempenho nas amostras que não utilizaram pré-inóculo, sendo que a umidade de 100% pode ter influenciado na estabilidade do biossurfactante produzido por reduzir sua concentração no meio (Figura 14 e 15).

O índice de emulsificação das amostras com umidade de 100% obteve bons resultados, tanto para as amostras com pré-inóculo líquido quanto sólido, sendo produzidos biossurfactantes de estabilidade (coeficiente angular da reta) alta e constante.

Em fermentações que utilizam o *Bacillus subtilis*, Nitschke; Pastore (2003) obtiveram, para fermentação submersa, utilizando manipueira como substrato, valores próximos de 43 mN/m², utilizando pré-inoculo feito com caldo nutriente. Já Bueno et al. (2011) obtiveram valores próximos de 33 mN/m², sem a adição de pré-inoculo, o que indica, em concordância com este estudo, que tal procedimento pode se tornar desnecessário, de acordo com as condições propostas.

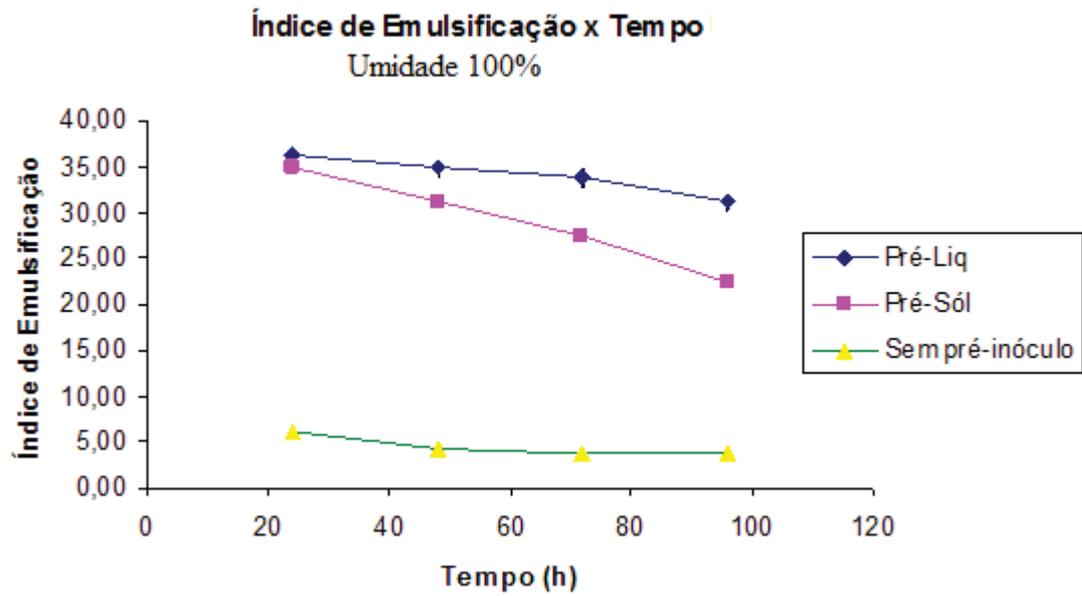


FIGURA 14- Índice de Emulsificação x Tempo com umidade de 100%.

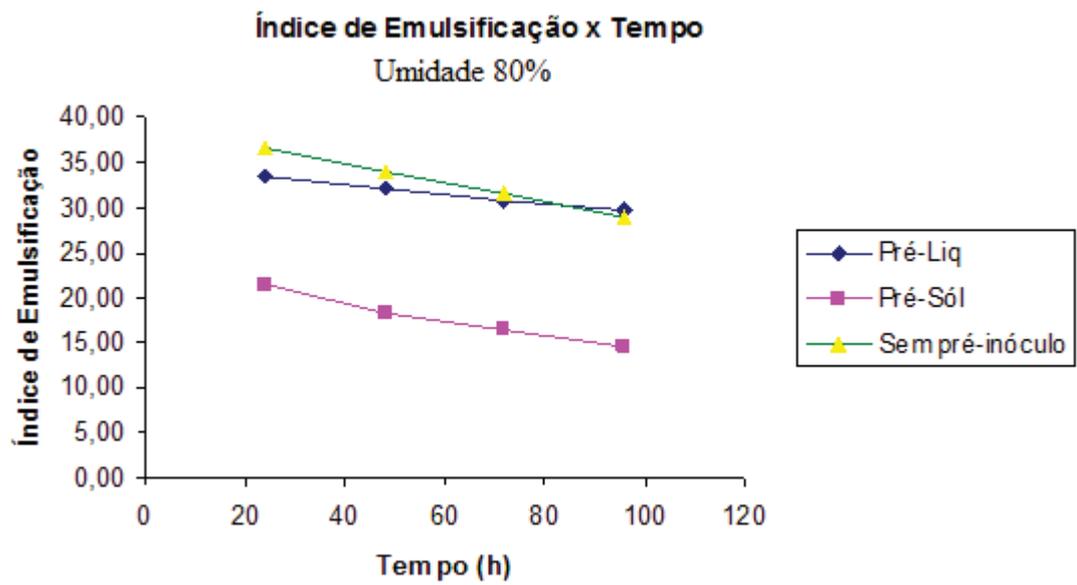


FIGURA 15 - Índice de Emulsificação x Tempo com umidades de 80%

6.1.2. Análise comparativa da tensão superficial de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis* por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

A redução da tensão superficial é o principal fator utilizado como indicativo da produção de biossurfactante, pois este tem como principal função a redução da tensão superficial de líquidos.

Foram feitos testes comparativos da produção desta macromolécula, produzida por *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis*, para avaliar o potencial produtor deste microrganismo com o primeiro já amplamente estudado para este fim.

De acordo com os resultados de tensão superficial, observou-se a produção do biossurfactante (Figura 13), já que houve redução desta em todos os casos. Porém a taxa de redução de tensão superficial do biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus subtilis* foi superior em todos os casos.

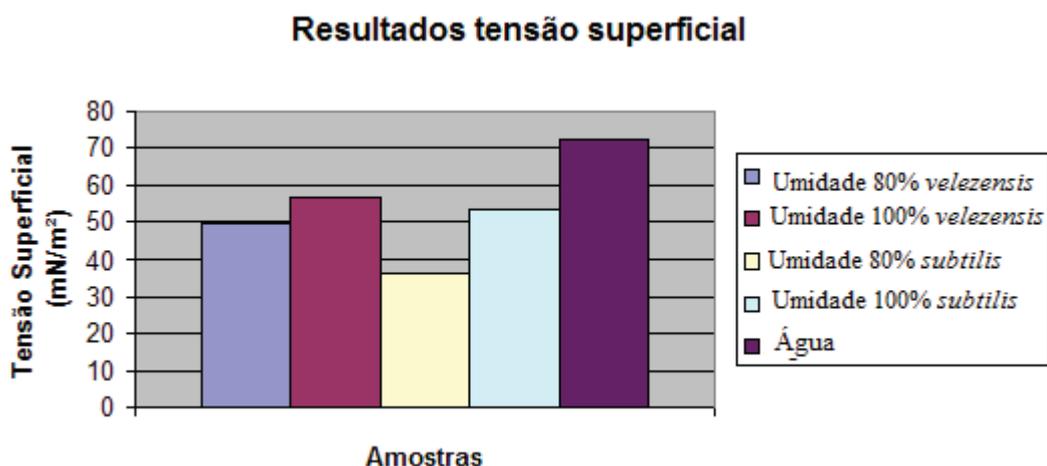


FIGURA 16 - Determinação da tensão superficial das fermentações com *Bacillus subtilis*, e *Bacillus velezensis* com umidade de 80 e 100%

Os resultados para *Bacillus subtilis* confirmaram o que foi reportado por Cooper et al. (1981), Peypoux et al (1999) e Nitschke; Pastore (2006), porém o *Bacillus velezensis* não demonstrou ter o mesmo potencial de produção deste tensoativo.

6.1.3. Teste de confiabilidade da análise de tensão superficial pela lei de Tates.

Para caso não haja disponibilidade de um tensiômetro, foi verificada a opção de fazer as análises de tensão superficial utilizando o método proposto pela lei de Tates.

Assim, foi medida a tensão superficial da glicerina pela Lei de Tates utilizando a água como o líquido de tensão superficial conhecida e comparou-se os resultados obtidos com os valores encontrados no Handbook of Chemistry and Physics, obtendo-se assim os seguintes resultados:

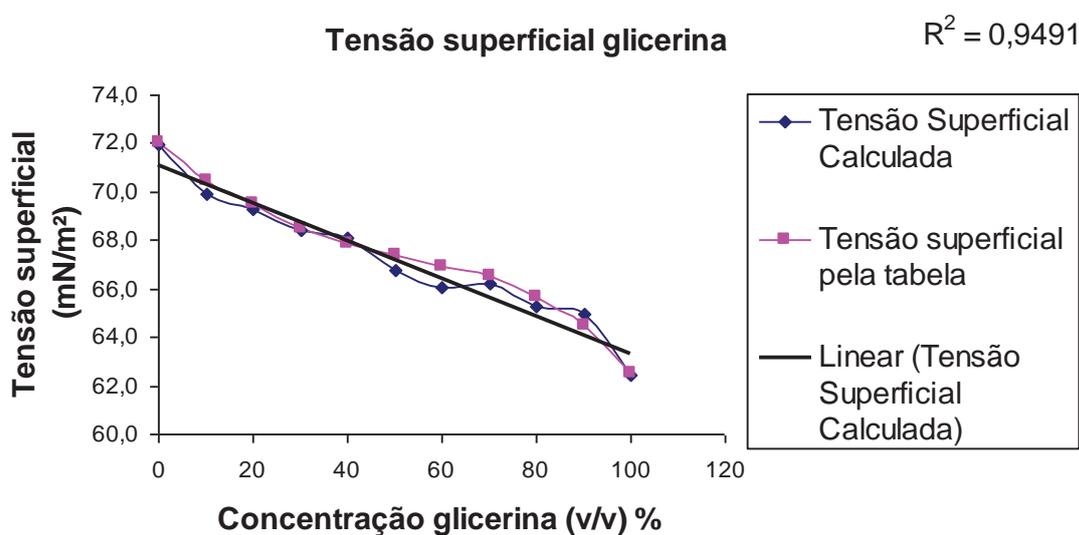


FIGURA 17 - Tensão Superficial da glicerina medida pelo método de peso de gotas em comparação pelo descrito em literatura.

As análises de tensão superficial utilizando a Lei de Tates obtiveram resultados confiáveis (94,91 %) em relação aos valores encontrados em literatura (LIDE, 2007), e que podem ser utilizados com segurança para análises com esta finalidade. Quando comparada com a eficiência descrita por Teixeira Neto et al. (2009), verificou-se que os testes efetuados foram 17% mais precisos.

6.1.4. Efeito do congelamento no índice de emulsificação de biossurfactantes produzido por fermentação em estado sólido por *Bacillus velezensis*.

Para constatar o efeito da estocagem do fermentado sob congelamento, foram feitas análises do índice de emulsificação das amostras que foram mantidas congeladas, para verificar se o biossurfactante continua tendo a capacidade de formar emulsões (espuma) em presença de um composto hidrofóbico (óleo de soja)

Produziu-se o biossurfactante utilizando farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido utilizando o microrganismo *Bacillus velezensis* nas condições propostas anteriormente. De acordo com os resultados expostos na Figura 18, verifica-se que o congelamento reduziu bastante o poder de emulsificação do biossurfactante.

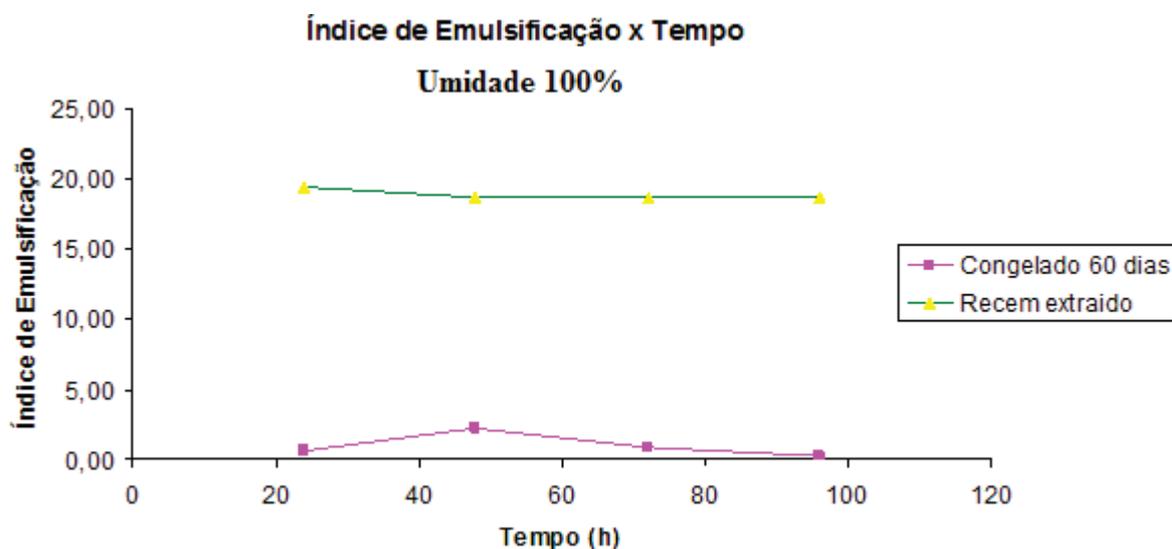


FIGURA 18 - Índice de emulsificação

Assim, conclui-se que o congelamento não é a maneira mais indicada para a estocagem do biossurfactante, pois acarreta em uma grande redução do poder de emulsificação deste. O mesmo efeito foi constatado por Sambrook et al. (1989), Johnson; Hecht (1994) e Yakhnin et al. (1998), que também submetem macromoléculas ao efeito de congelamento e descongelamento, verificando-se o rompimento destas.

6.2. ANÁLISES DE REPRODUTIBILIDADE DAS FERMENTAÇÕES

Foi feita a análise estatística ANOVA pelo software minitab®, para verificar a reprodutibilidade dos dados para todos os parâmetros estudados. Estão descritas a seguir todas as condições de fermentação utilizadas na fermentação pelas tabelas:

6.2.1. Tensão superficial

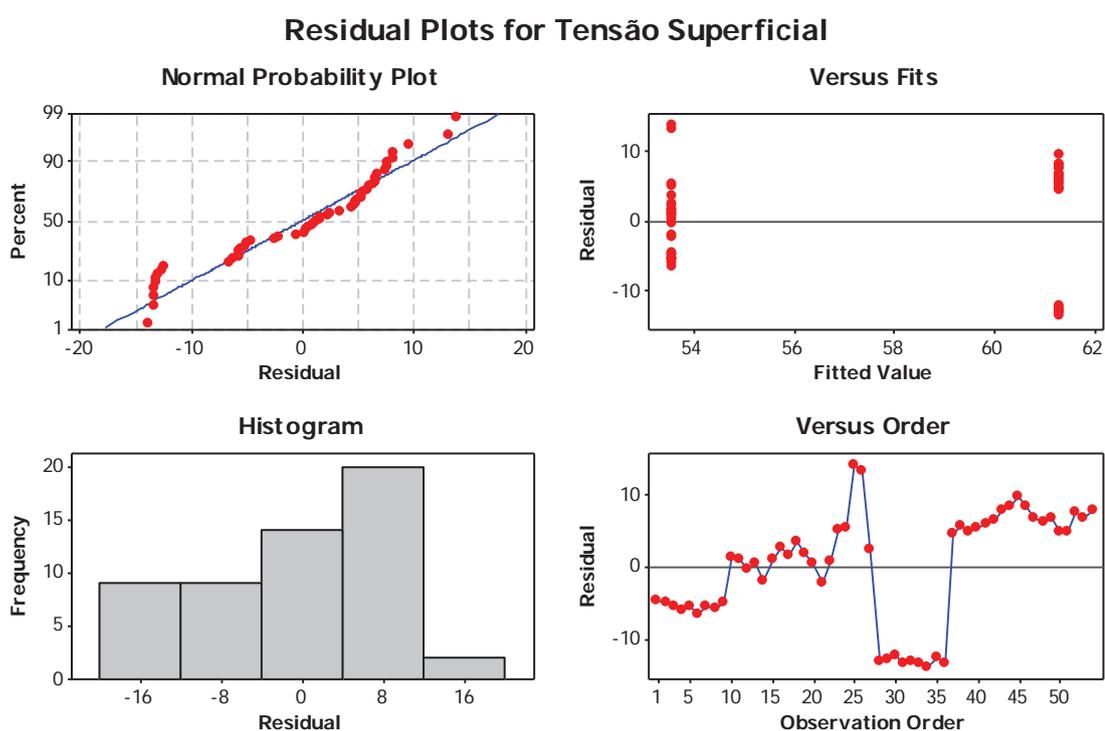


FIGURA 19 - Comparação entre as diferentes fermentações da tensão superficial

Com base nos valores de F calculado ($1,64 < F$ teórico ($1,671$), tabela 3, não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 3 - ANOVA Tensão superficial

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	809,7	809,7	1,64	0,001
Error	52	3087,6	59,4	-	-
Total	53	3897,2	-	-	-

6.2.2. E24, E48, E72 e E96

Na primeira análise, foi feita a medição do índice de emulsificação de 24 em 24 horas.

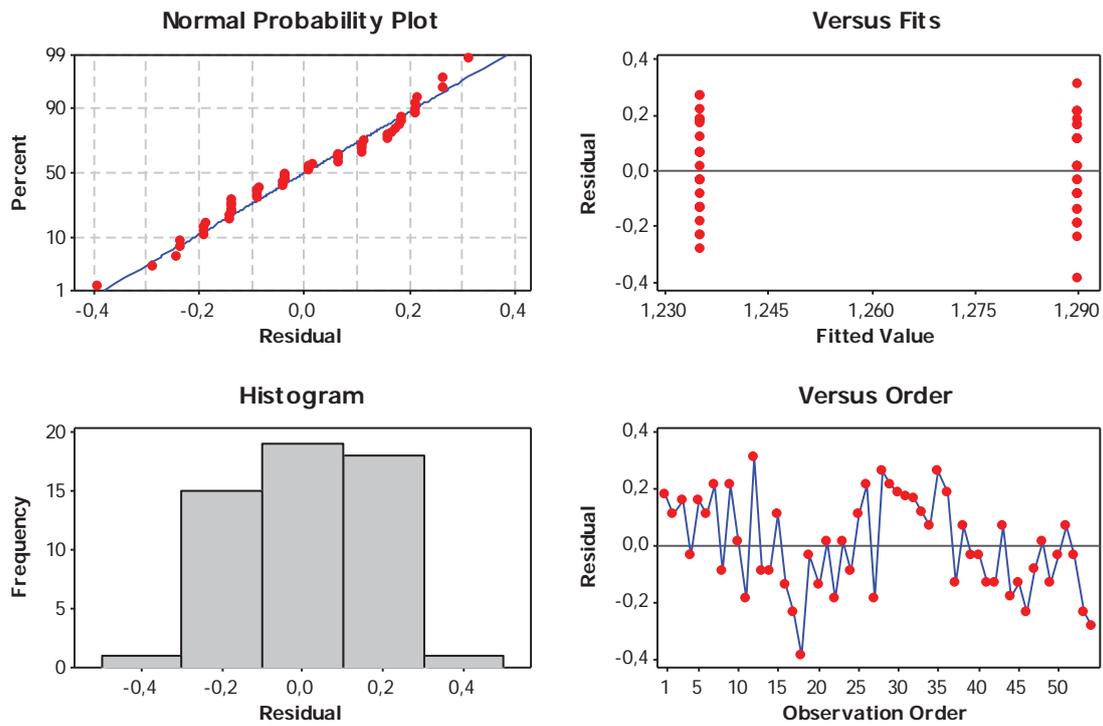


FIGURA 20 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E24

Com base nos valores de F calculado ($1,46 < F$ teórico ($1,671$)) (Tabela 4), não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 4 - ANOVA E24

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	0,0400	0,0400	1,46	0,233
Error	52	1,4260	0,0274	-	-
Total	53	1,4660	-	-	-

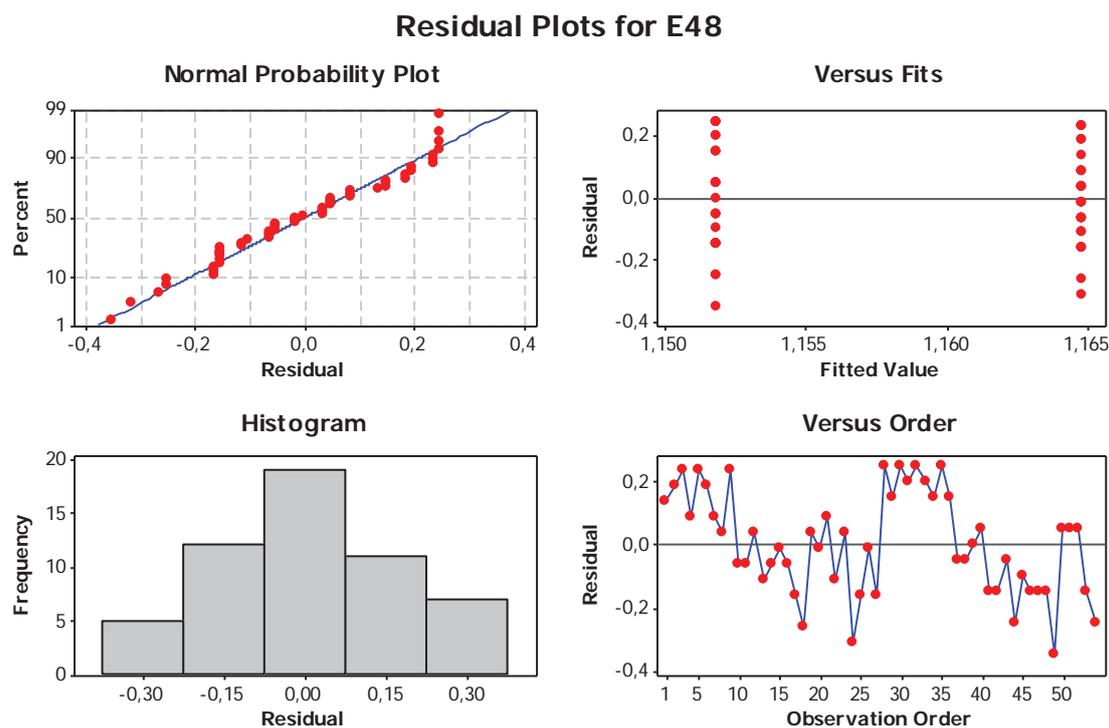


FIGURA 21 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E48

Com base nos valores de F calculado ($0,09 < F$ teórico $1,671$) (Tabela 5), não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 5- ANOVA E48

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	0,0023	0,0023	0,09	0,771
Error	52	1,3815	0,0266	-	-
Total	53	1,3838	-	-	-

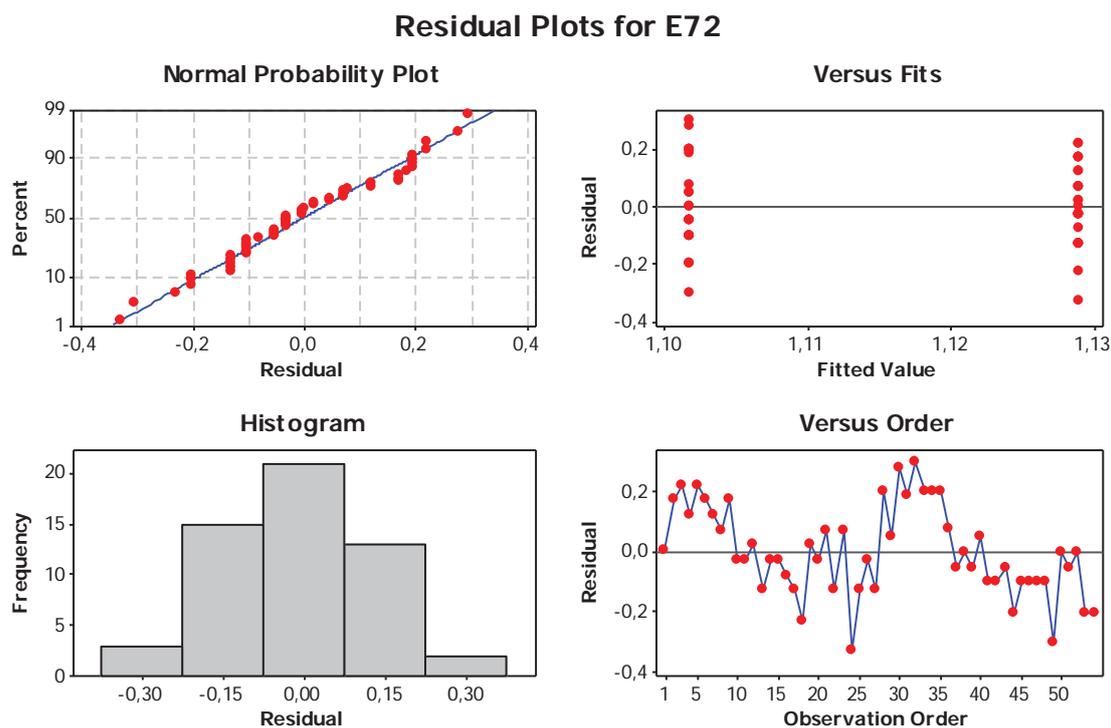


FIGURA 22 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E72

Com base nos valores de F calculado ($0,45 < F$ teórico (1, 671) (tabela 6), não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 6 - ANOVA E72

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	0,0099	0,0099	0,45	0,506
Error	52	1,1417	0,0220	-	-
Total	53	1,1515	-	-	-

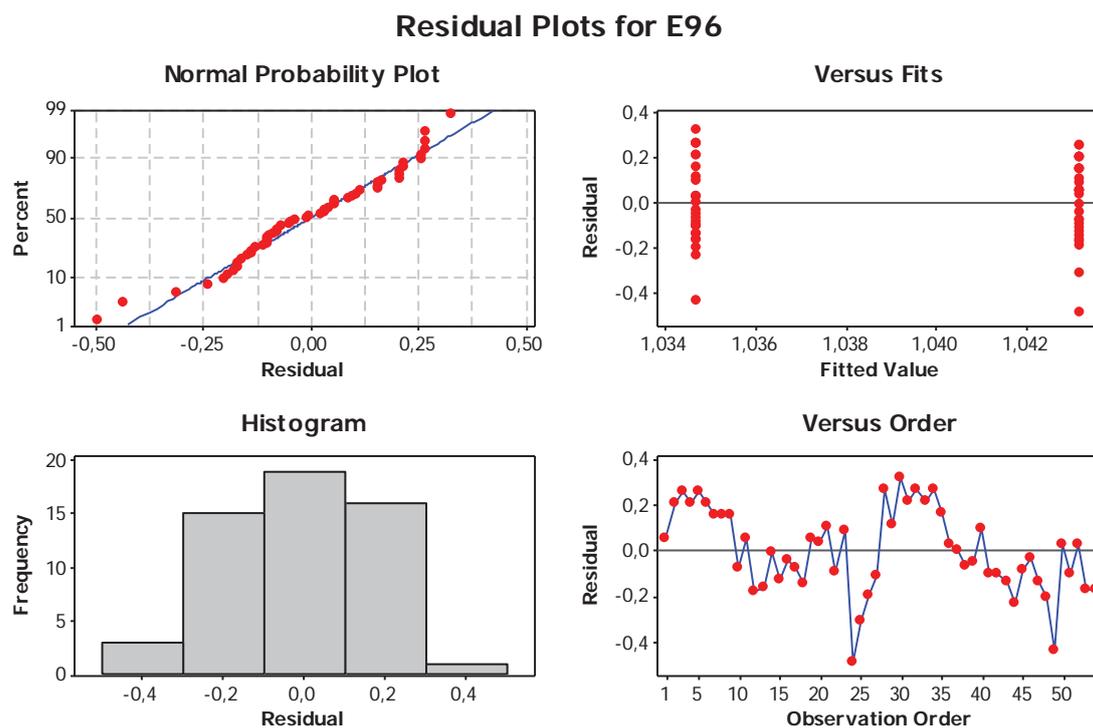


FIGURA 23 - Comparação entre as diferentes fermentações em função da altura da camada de emulsão (cm) do E96

Com base nos valores de F calculado ($0,03 < F$ teórico (1,671) (tabela 7), não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 7 - ANOVA E96

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	0,0010	0,0010	0,03	0,865
Error	52	1,7556	0,0338	-	-
Total	53	1,7566	-	-	-

6.2.3. Atividade Emulsificante

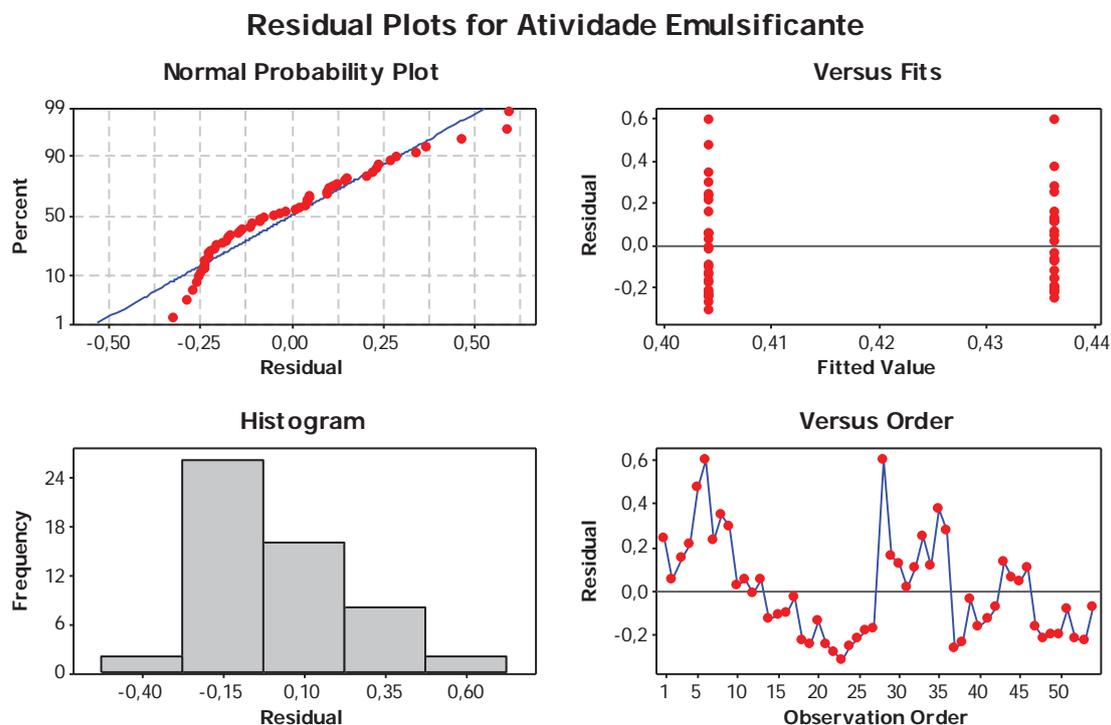


FIGURA 24 - Comparação entre as Atividades Emulsificantes obtidas

Com base nos valores de F calculado ($0,26 < F$ teórico (1,671)), (tabela 8), não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 8 - ANOVA Atividade Emulsificante

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	0,0140	0,0140	0,26	0,610
Error	52	2,7480	0,0528	-	-
Total	53	2,7619	-	-	-

6.2.4. CMC

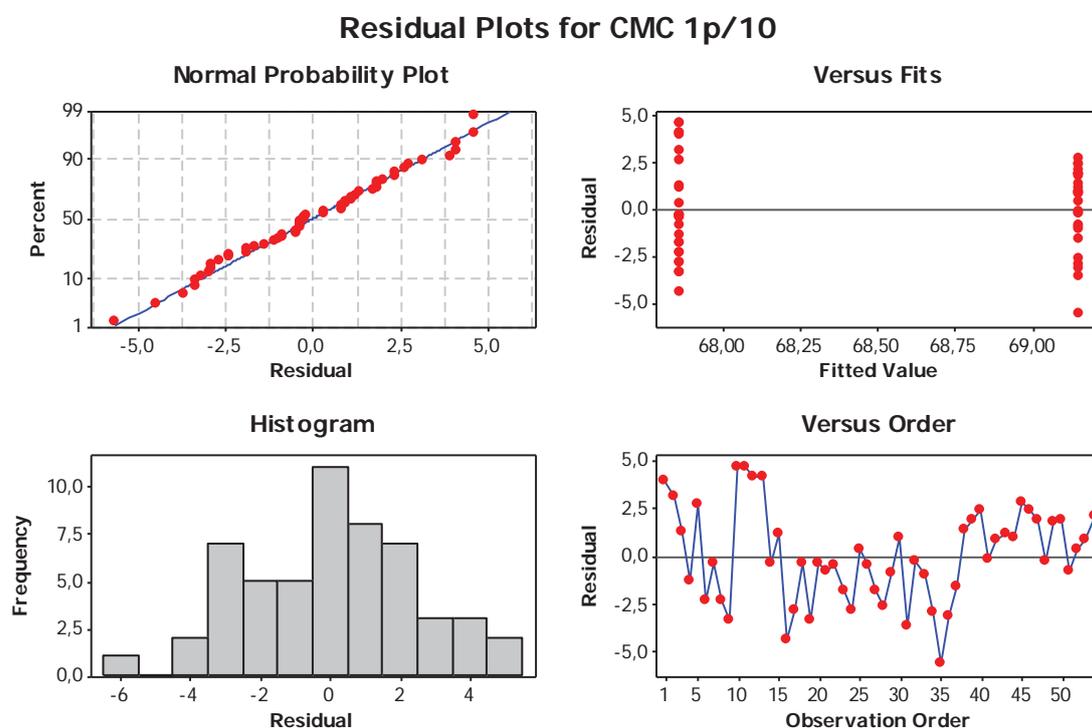


FIGURA 25 - Comparação entre os CMC com diluição 1p/10.

Com base nos valores de F calculado (3,54) > F teórico (1,671) (tabela 9), houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 9 - ANOVA CMC 1p/10

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	22,43	22,46	3,74	0,059
Error	52	312,64	6,00	-	-
Total	53	334,64	-	-	-

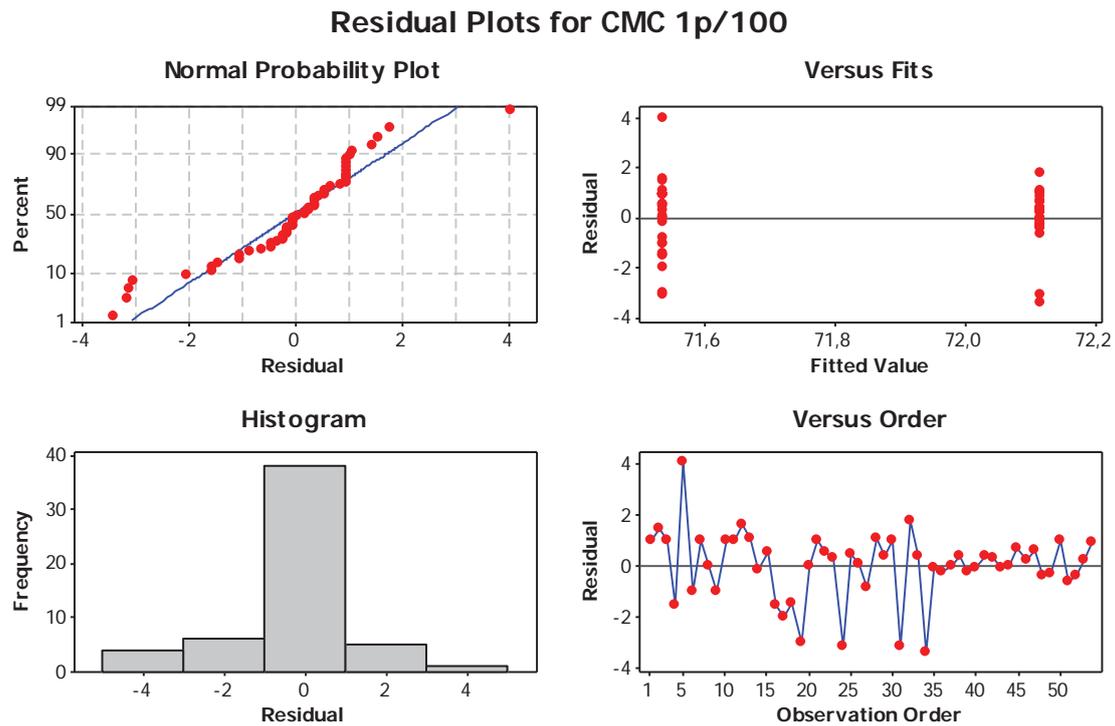


FIGURA 26 - Comparação entre os CMC com diluição 1p/100.

Com base nos valores de F calculado (2,56) > F teórico (1,671) (tabela 10), houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 10 - ANOVA CMC 1p/100

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	4,56	4,56	2,56	0,115
Error	52	92,54	1,78	-	-
Total	53	97,11	-	-	-

6.2.5. pH

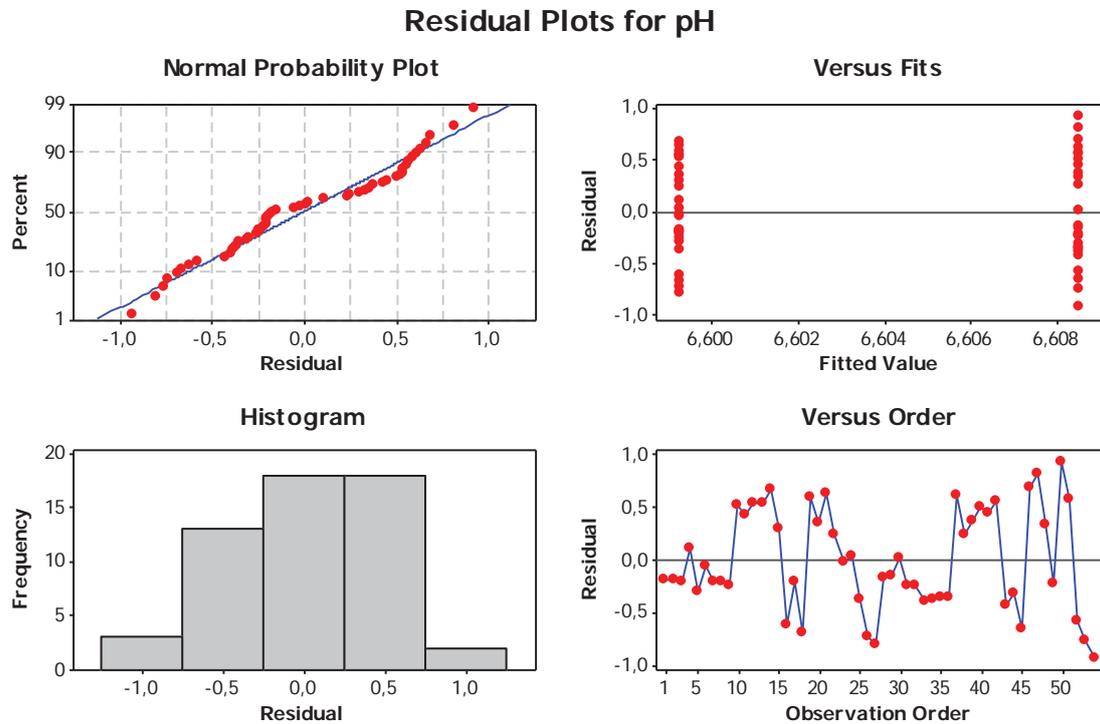


FIGURA 27 - Comparação entre os pH

Com base nos valores de F calculado ($0,00 < F$ teórico (1,671) (tabela 11), não houve diferenças significativas nas análises representadas com intervalo de confiança de 5%, o que não prejudica a reprodutibilidade destes dados para este tipo de análise.

Tabela 11-ANOVA pH

Source	DF	SS	MS	F	P
Réplica	1	0,001	0,001	0,00	0,944
Error	52	12,171	0,234	-	-
Total	53	12,172	-	-	-

Assim, conclui-se que, para todos os casos, exceto CMC com diluição 1p/10 e CMC com diluição 1p/100, a reprodutibilidade dos dados poderá ser feita nas condições propostas.

6.3. SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE CULTIVO

6.3.1. Análise de tensão superficial

Esta análise teve como objetivo verificar em quanto o biossurfactante produzido tem a capacidade de reduzir a tensão superficial.

Primeiramente, verificou-se o substrato que proporcionou ao microrganismo maior produção de biossurfactante pela redução de tensão superficial.

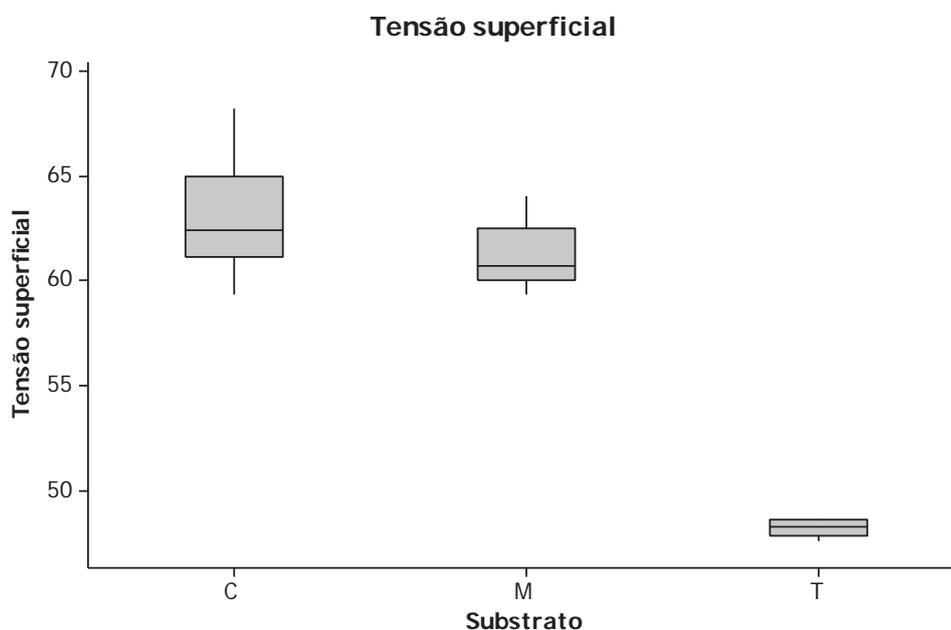


FIGURA 28 - Tensão superficial obtida a partir de diferentes meios de cultura (C= crueira; M = farelo de mandioca; T=farelo de trigo) (tensão superficial da água = 72 mN/m²)

Pelas análises gráficas dos resultados, verificou-se que o substrato que proporcionou ao microrganismo uma melhor condição para produção de biossurfactante foi o farelo de trigo.

Assim, posteriormente, dentro das condições (Tabela 12) que foram variadas para o mesmo substrato (% umidade e umidificantes), verificou-se qual a melhor condição obtida.

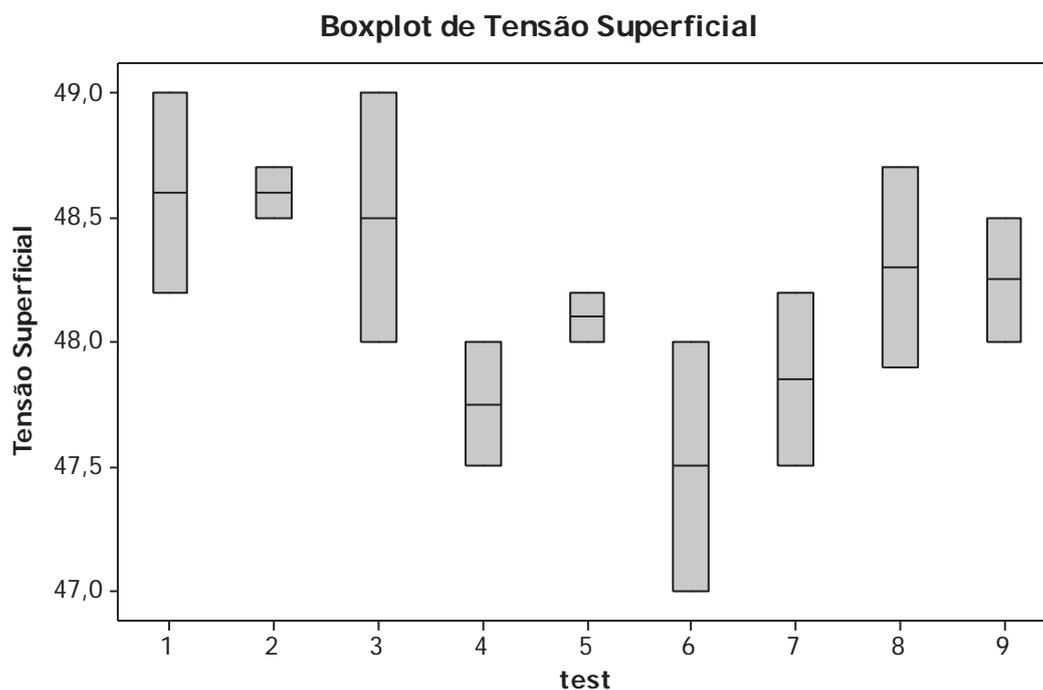


FIGURA 29 - Tensão superficial para fermentações contendo farelo de trigo como substrato.

Tabela 12 Testes envolvendo o substrato farelo de trigo

test	Substrato	Agente umidificantes	Umidade
1	Farelo de trigo	Solução Tampão	40,00%
2	Farelo de trigo	Solução Tampão	60,00%
3	Farelo de trigo	Solução Tampão	80,00%
4	Farelo de trigo	Água de laticínios	40,00%
5	Farelo de trigo	Água de laticínios	60,00%
6	Farelo de trigo	Água de laticínios	80,00%
7	Farelo de trigo	Manipueira	40,00%
8	Farelo de trigo	Manipueira	60,00%
9	Farelo de trigo	Manipueira	80,00%

Pelo gráfico anterior (Figura 29), conclui-se que a melhor condição de redução de tensão superficial obtida foi com água residuária da indústria de laticínios como umidificante a uma umidade de 80%.

Os resultados mostraram que o biossurfactante testado reduziu a tensão da água de 72,31 para 47,00 mN/m no melhor dos testes. Estes resultados foram um pouco inferiores aos reportados por Cooper et al. (1981), que foi de 28 mN/m² utilizando hexadecano como fonte de carbono com os microrganismo *Bacillus Cereus* e Nitschke; Pastore (2006) que obtiveram valores de 33 mN/m² utilizando suco de caju como substrato.

6.3.2. Análise de Índice de Emulsificação

Um importante parâmetro de avaliação do poder de um emulsificante é o Índice de Emulsificação (IE) e da estabilidade da emulsão (COOPER; GOLDENBERG, 1987; ABURUWAIDA., 1991; NITSCHKE et al., 2004; COSTA, 2005).

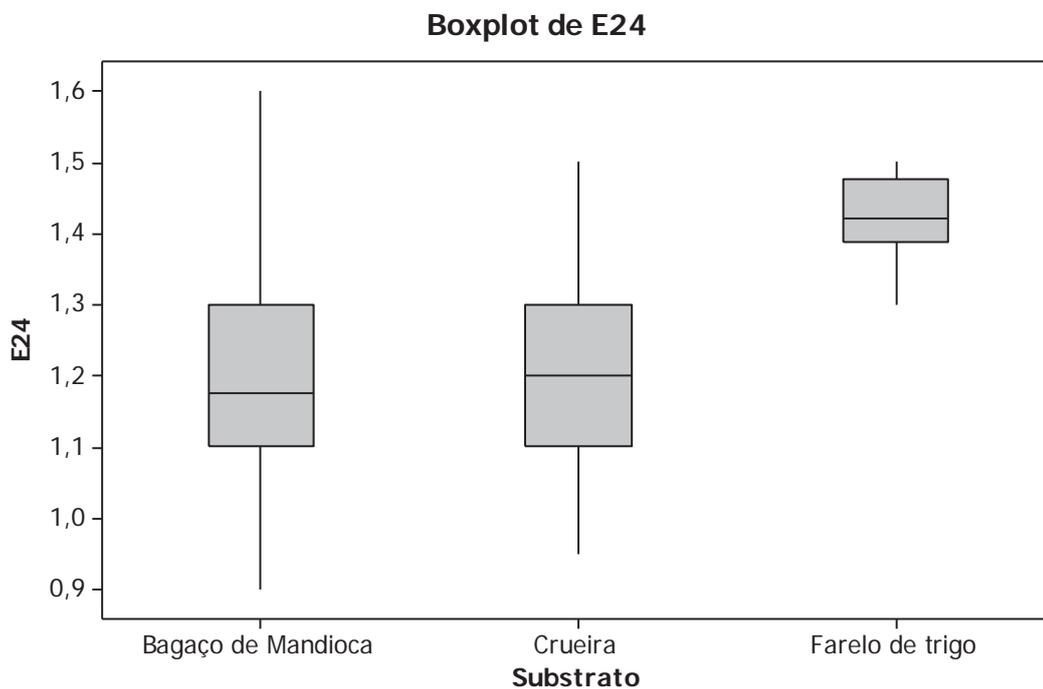


FIGURA 30- Índice de emulsificação E24 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crureira e farelo de trigo)

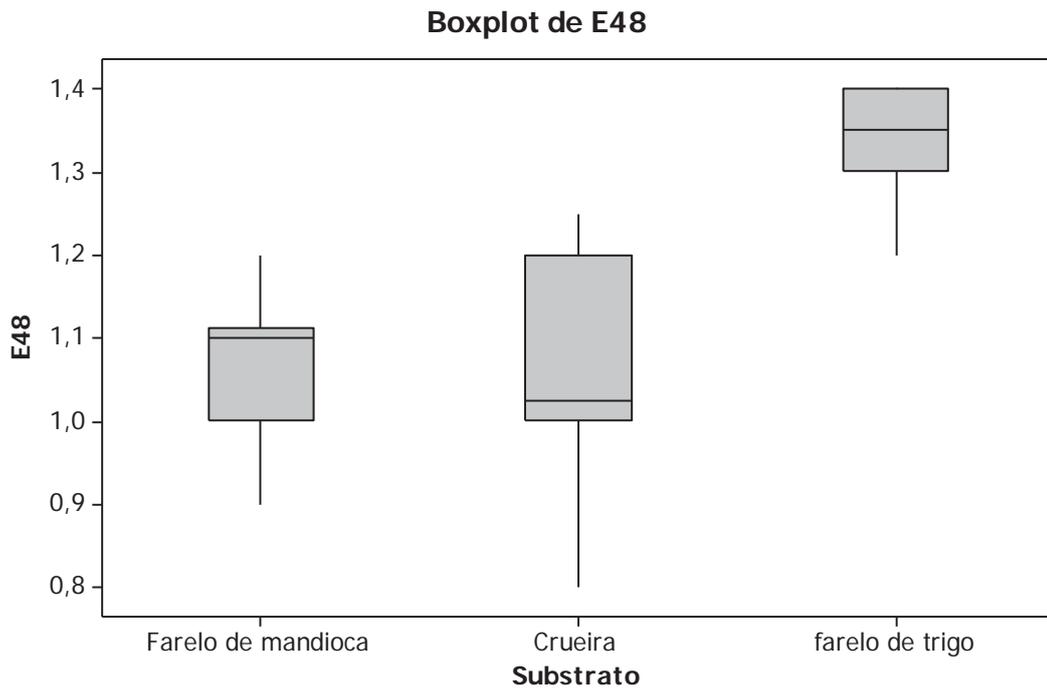


FIGURA 31 - Índice de emulsificação E48 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crureira e farelo de trigo)

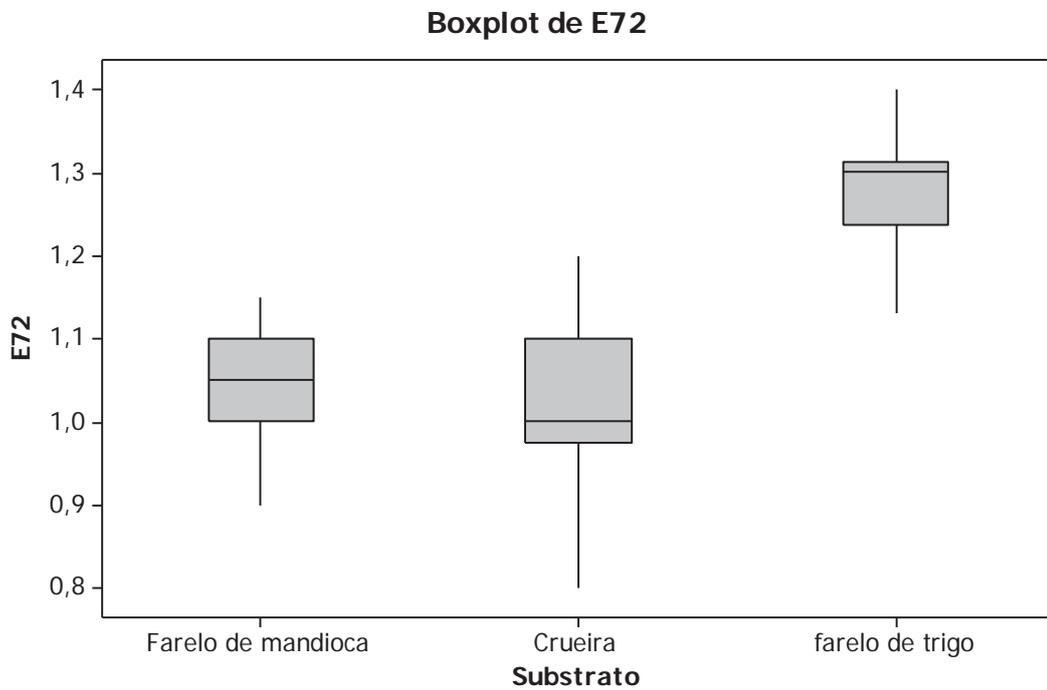


FIGURA 32 - Índice de emulsificação E72 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crureira e farelo de trigo)

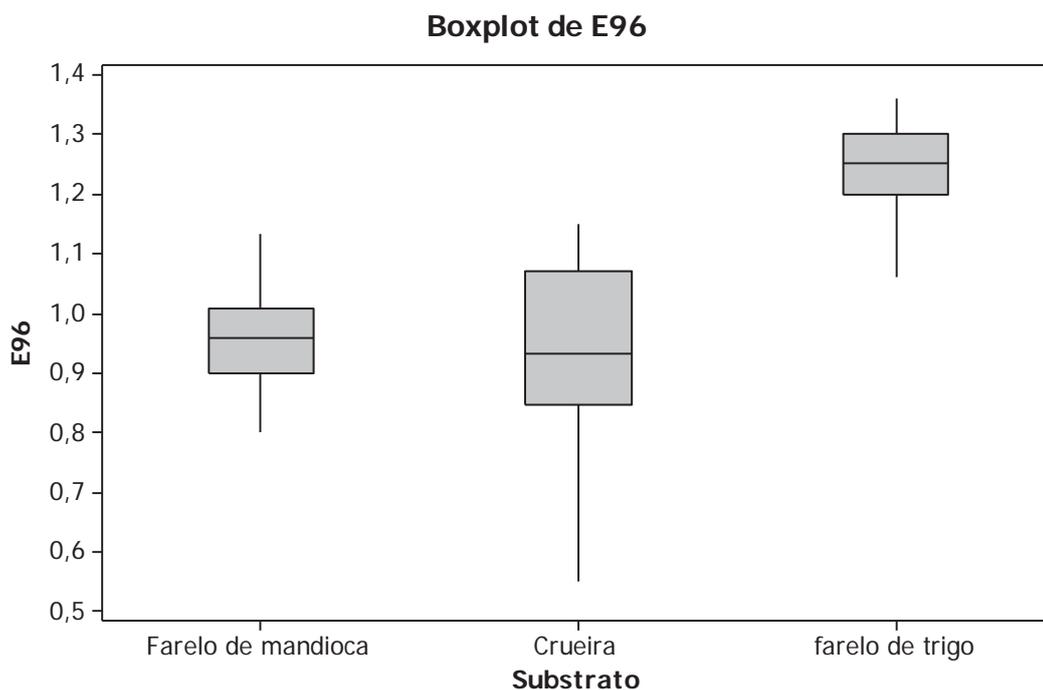


FIGURA 33 – Índice de emulsificação E96 (utilizando como substrato bagaço de mandioca, crureira e farelo de trigo)

Pode-se observar que, para o índice de formação de espuma, o biossurfactante proveniente da análise que continha farelo de trigo como substrato obteve um melhor resultado.

Analisando as condições em que se utilizou o farelo de trigo, como substrato, tem-se:

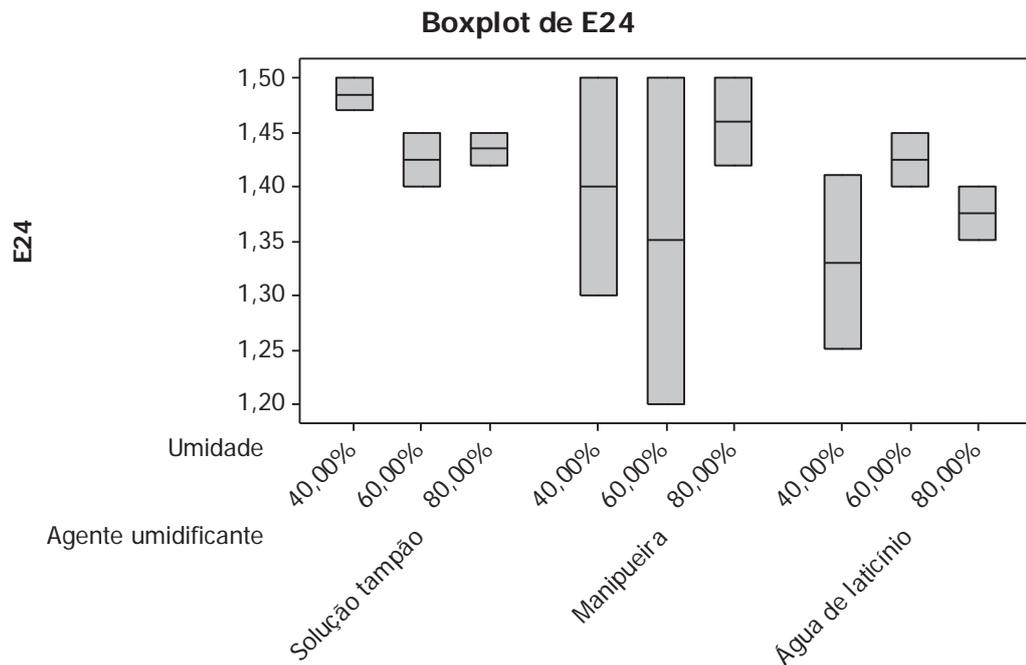


FIGURA 34 Índice de emulsificação E24 para análises contendo farelo de trigo como substrato.

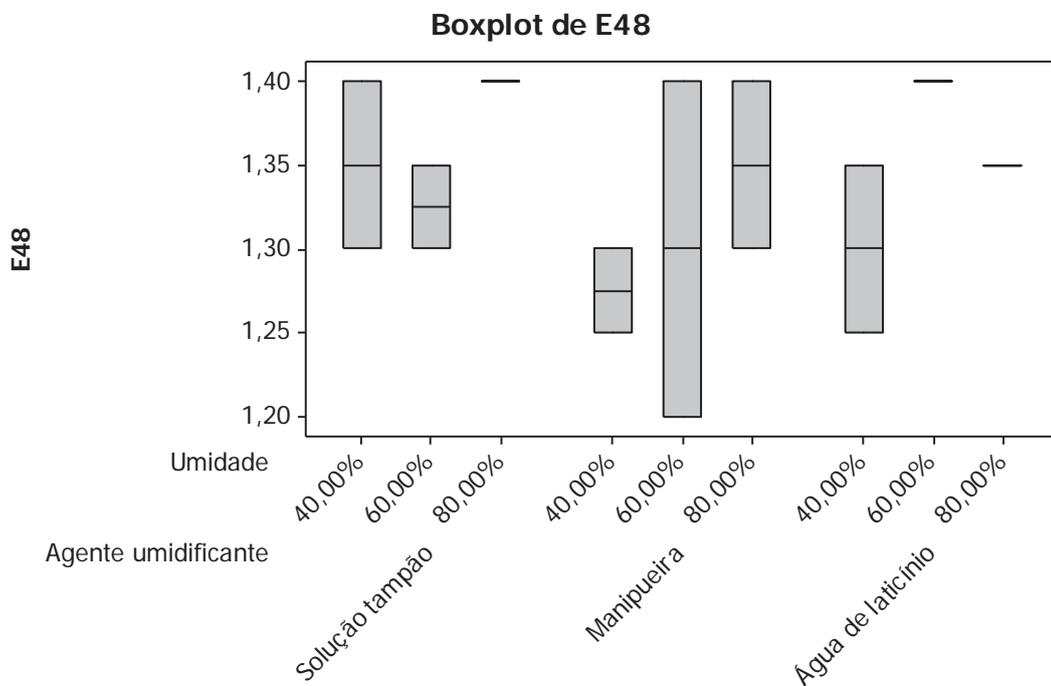


FIGURA 35- Resultados para índice de emulsificação E48 para análises contendo farelo de trigo como substrato.

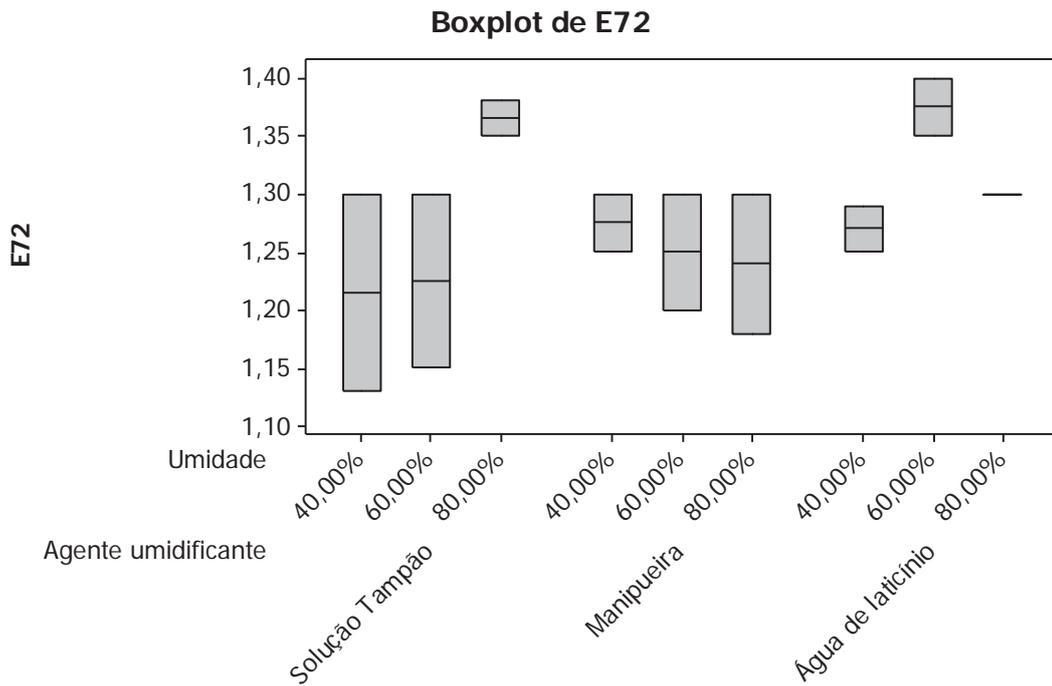


FIGURA 36 - Resultados para índice de emulsificação E72 para análises contendo farelo de trigo como substrato.

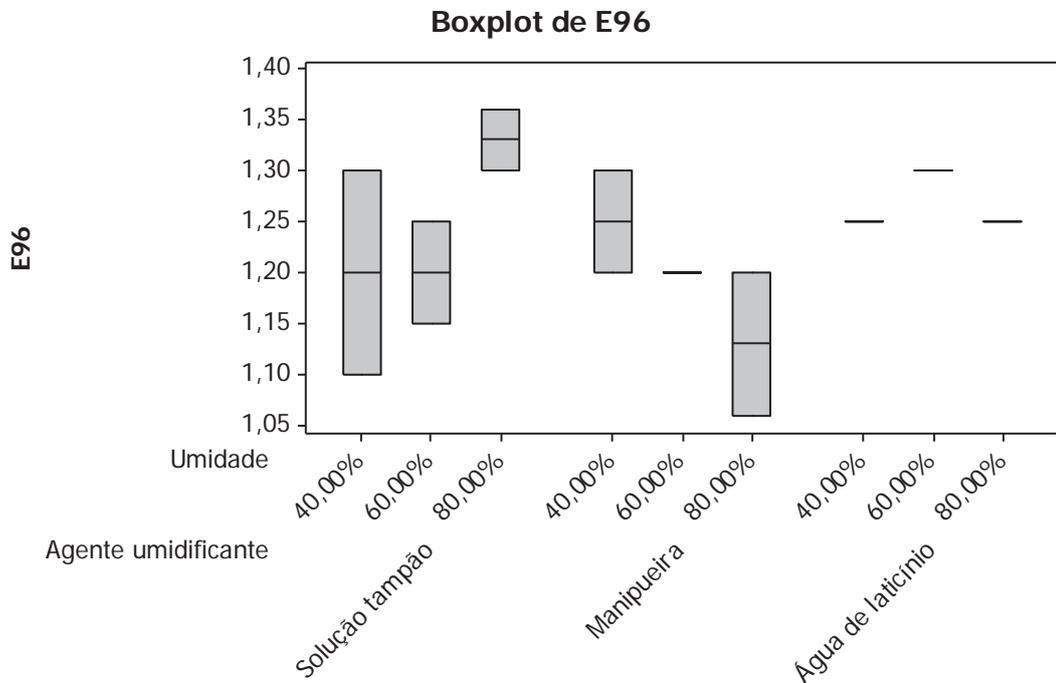


FIGURA 37 - Resultados para índice de emulsificação E48 para análises contendo farelo de trigo como substrato.

Verificou-se que as amostras contendo manipueira como agente umidificante em 60% de umidade obtiveram maior camada de espuma em E24 (Figura 34). Porém, no decorrer das 96 horas, constatou-se que, tanto para emulsificação quanto para estabilidade da espuma conferida pelo biossurfactante, as amostras com 80% de umidade e utilizando água residuária da indústria de laticínios obtiveram melhores resultados.

Os resultados mostraram que o biossurfactante testado exibiu um excelente índice de emulsificação, com camadas de emulsões que tiveram reduções próximas a 10 - 15% entre E24 a E96, semelhantes aos dados reportados por Barros *et al.* (2008).

6.3.3. Análise de CMC

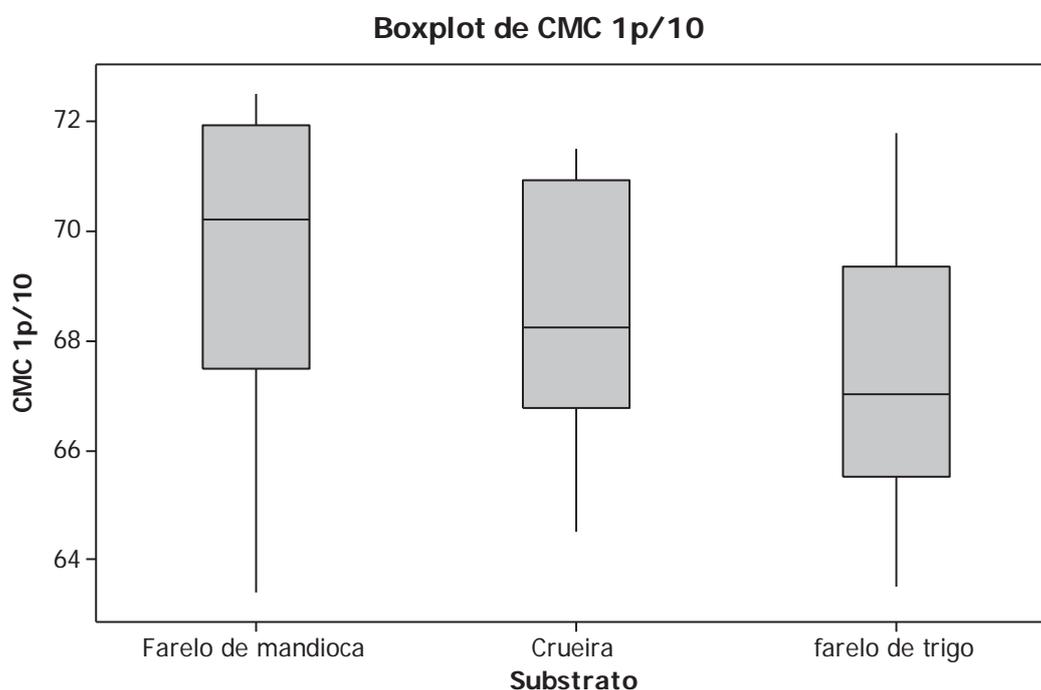


FIGURA 38– Concentração micelar crítica diluição 1 p/ 10.

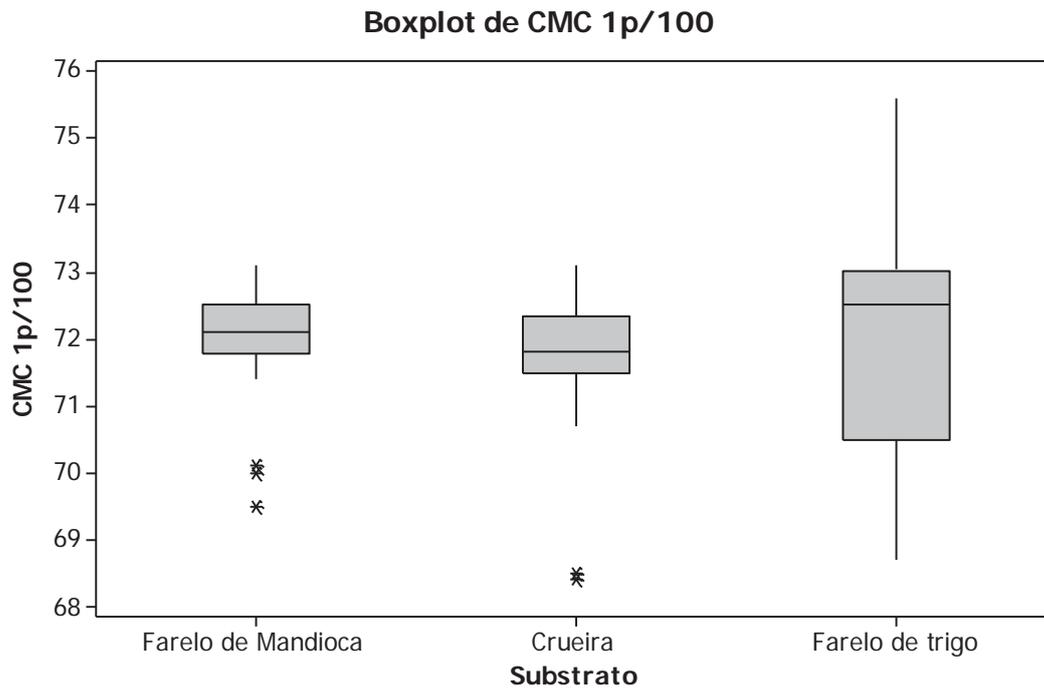


FIGURA 39 - Concentração micelar crítica com diluição 1 p/ 10.

Quanto à concentração micelar crítica, obteve-se o melhor resultado nos testes que se utilizou farelo de trigo como substrato.

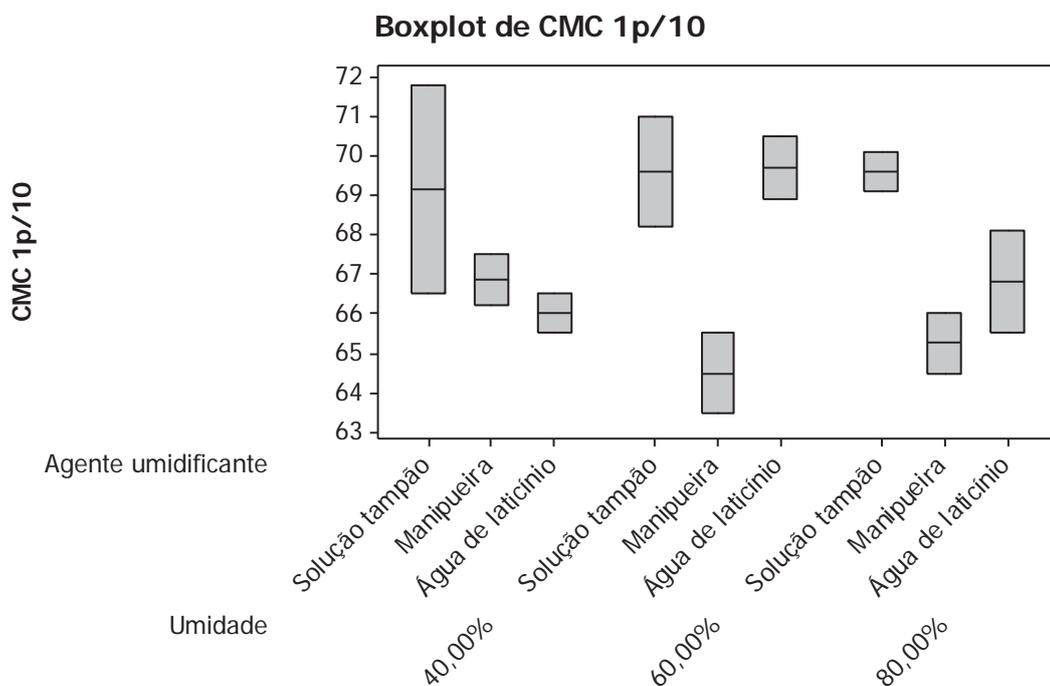


FIGURA 40 - Concentração micelar crítica diluição 1 p/ 10 analisando as condições diversas.

Ao se analisar as condições de fermentação do farelo de trigo, verificou-se, ao diluir o caldo do fermentado em 10 vezes, que as amostras contendo umidades de 60 e 80% obtiveram destaque nos testes que utilizaram manipueira como umidificante, pois esta conferiu maior estabilidade às micelas do biossurfactante.

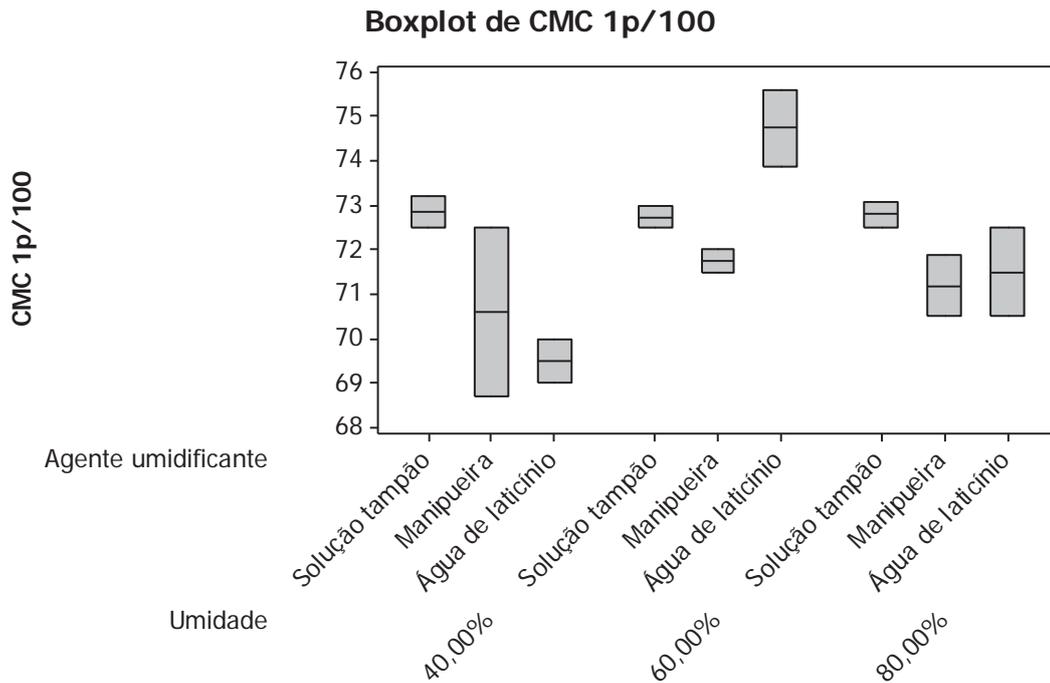


FIGURA 41 - Concentração micelar crítica diluição 1 p/ 100 analisando as condições diversas.

Feita a diluição um para cem, verificou-se que os surfactantes que ainda apresentavam alguma atividade superficial foram os com umidade de 40%, mas pode ser facilmente explicado devido à baixa umidade inicial do mesmo. E confirmando, a umidade de 80%, de acordo com a CMC, mostrou ser a melhor para a produção do surfactante, com destaque para as fermentações que utilizaram água de laticínios e manipueira como agentes umidificantes.

Os valores de CMC-1p/10 e CMC-1p/100 foram, aproximadamente, 65-72 mN/m². Estes valores mostram-se altos aos encontrados por Sheppard; Mulligan (1987), de 27 mN/m², e também muito altos comparado com os reportados por Nitschke; Pastore (2006), que foram de 28 e 32 mN/m², respectivamente.

6.3.4. Análise de pH

A análise de pH visa verificar em qual substrato ocorreu menores variações do pH dentro da faixa ótima do mesmo (5,8 – 6,8).

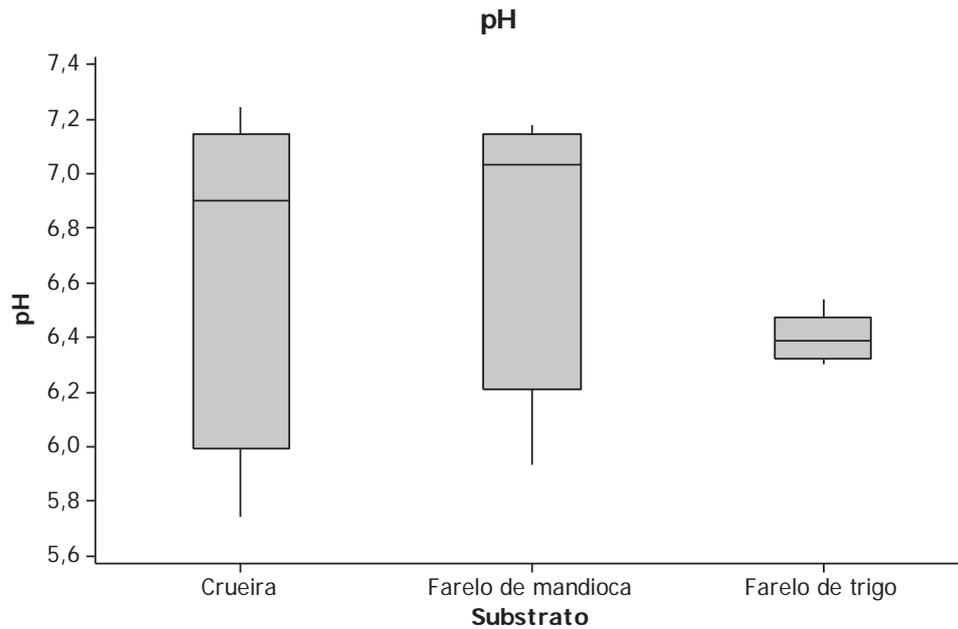


FIGURA 42 - Variação de pH nas diversas fermentações

Assim, de acordo com os resultados (Gráfico 41), verificou-se que, com o farelo de trigo, houve uma menor variação de pH em relação aos demais substratos. Este substrato inferiu maior capacidade “tamponante” ao sistema.

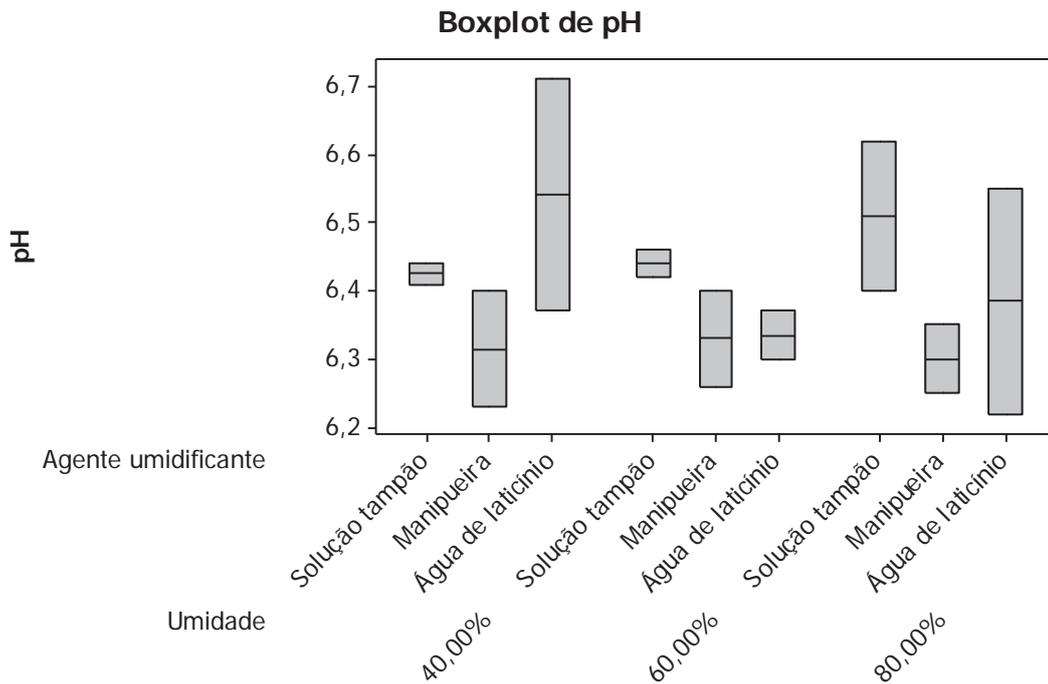


FIGURA 43 - Variação de pH no processo com farelo de trigo como substrato.

A solução-tampão teve a capacidade de manter os valores de pH dentro de uma determinada faixa (aproximadamente 6,8), porém os outros umidificantes também não apresentaram grandes variações, observando-se valores próximos aos valores utilizados por Nitschke; Pastore (2006).

6.3.5. Análise de atividade emulsificante

Novamente, os compostos em que se utilizou farelo de trigo para sua produção obtiveram os melhores resultados, com destaque especial aos umedecidos com água residuária de indústria de laticínio com umidade de 80%.

Os valores de atividade emulsificante indicam uma grande formação de bolhas com resultados próximos aos relatados por Castiglioni et al. (2009).

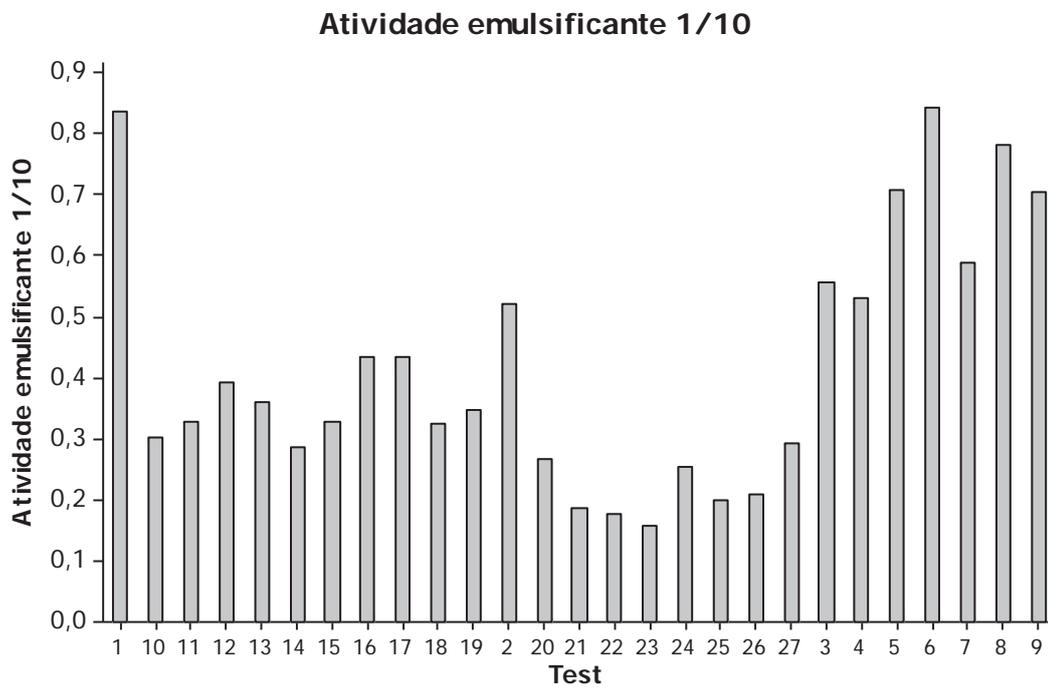


FIGURA 44 - Índice de emulsificação variando nas diversas condições de fermentação.

6.4. PRODUÇÃO EM BIORREATOR DE BANCADA

6.4.1. *Biorreator de coluna estático*

Foram feitos testes em biorreator de coluna com aeração forçada para avaliar se a maior disponibilidade de oxigênio interfere diretamente na produção de biossurfactante.

Foi utilizado o reator ilustrado nas imagens a seguir (Figura 45 e 46) que consiste em um biorreator de vidro com uma camisa externa para circulação de água para aquecimento do substrato até a temperatura de 37°C.

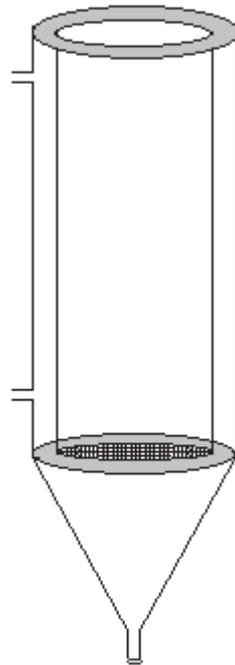


FIGURA 45 – Esquema do biorreator utilizado

Os resultados de tensão superficial para as fermentações conduzidas no biorreator de coluna estão ilustradas na figura a seguir (Figura 47):

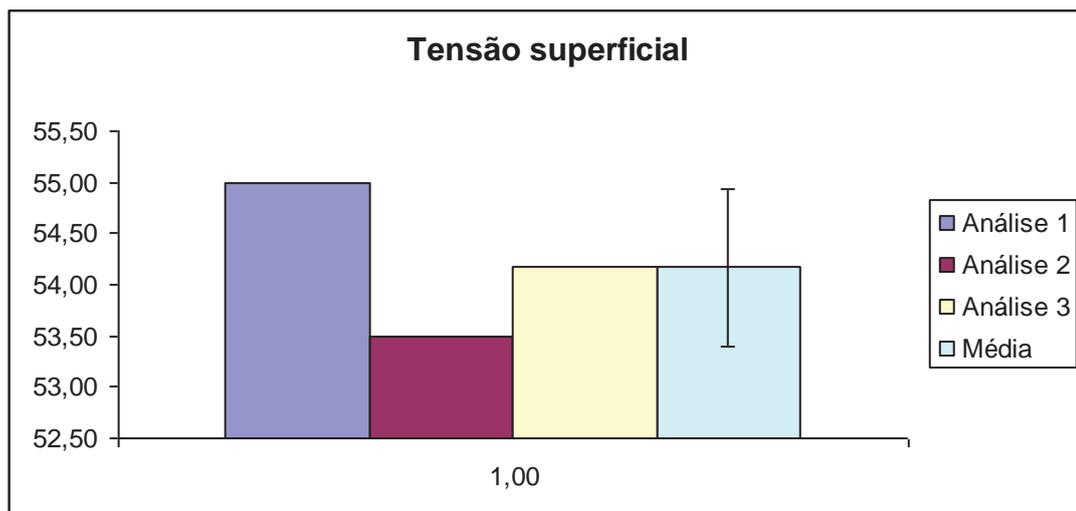


FIGURA – 46 Tensão superficial para a fermentação conduzida no biorreator de coluna estático com aeração forçada

As tensões superficiais medidas não obtiveram melhor desempenho no reator de coluna do que as obtidas em fermentação em sacos plásticos.



FIGURA 47– Frascos para medir índice de emulsificação

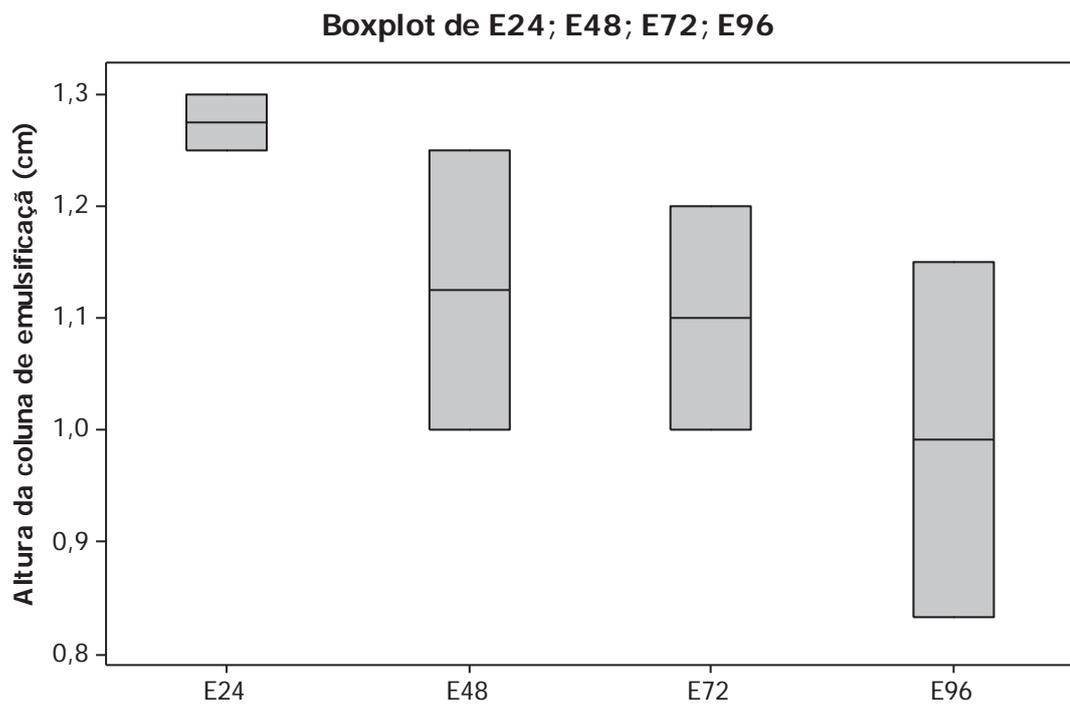


FIGURA 48– Índice de emulsificação medidos em 24, 48, 72 e 96 horas

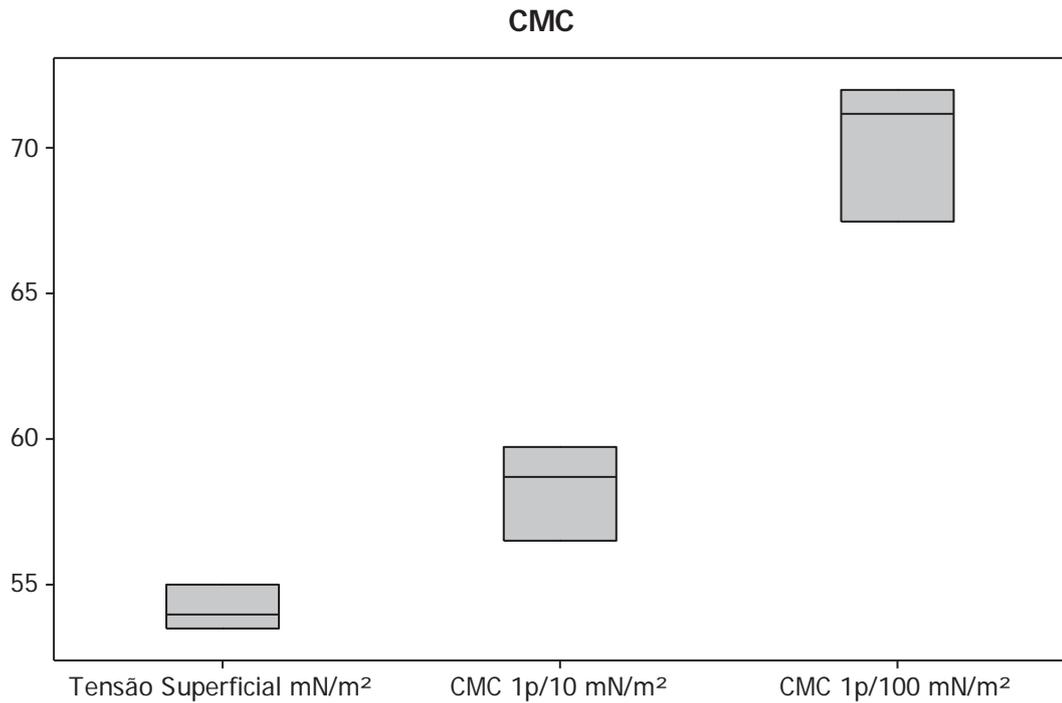


FIGURA 49– CMC medidos em diluições de 1p/10 v/v e 1p/100 v/v

O pH medido foi de 6,06, o que indica que a fermentação ocorreu dentro da faixa aceitável de pH para o micro-organismo.

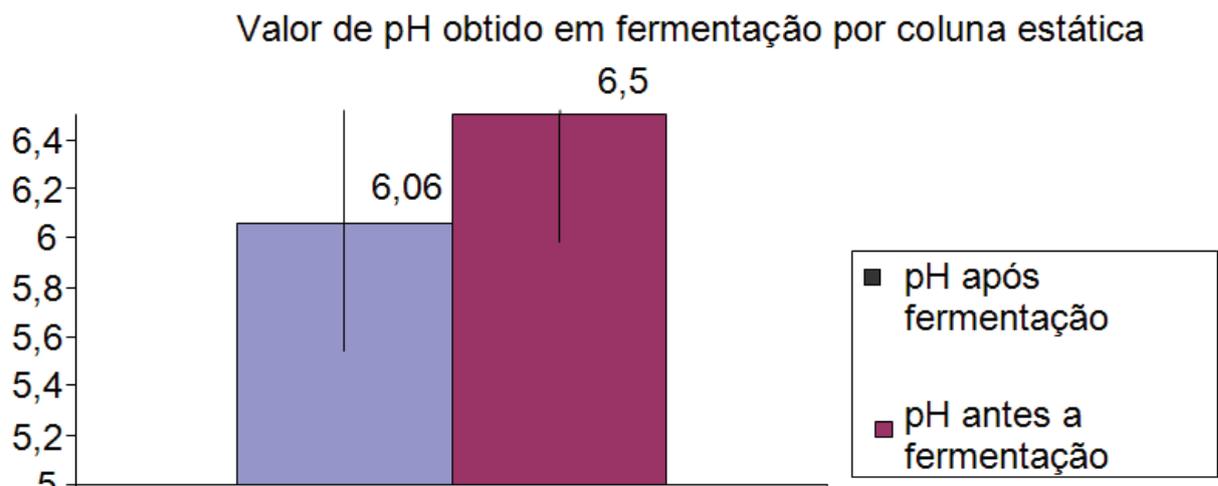


FIGURA 50– pH medido após a fermentação

A atividade emulsificante medida após a fermentação em diluição 1p/100 está apresentado na figura seguinte:

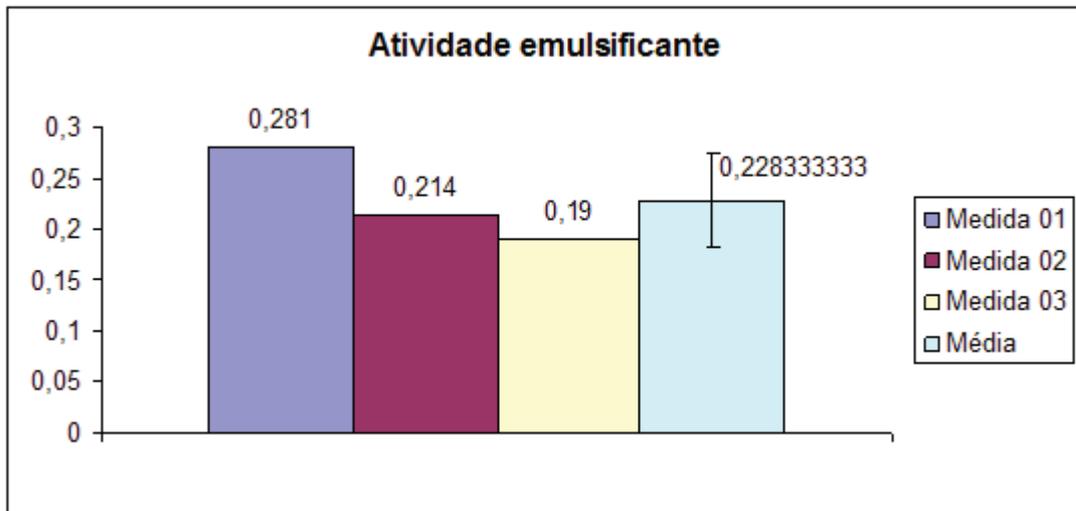


FIGURA 51 - Atividade emulsificante do biossurfactante medida em diluição 1p/100 v/v

A oscilação de temperatura no interior do biorreator está descrita no gráfico a seguir:

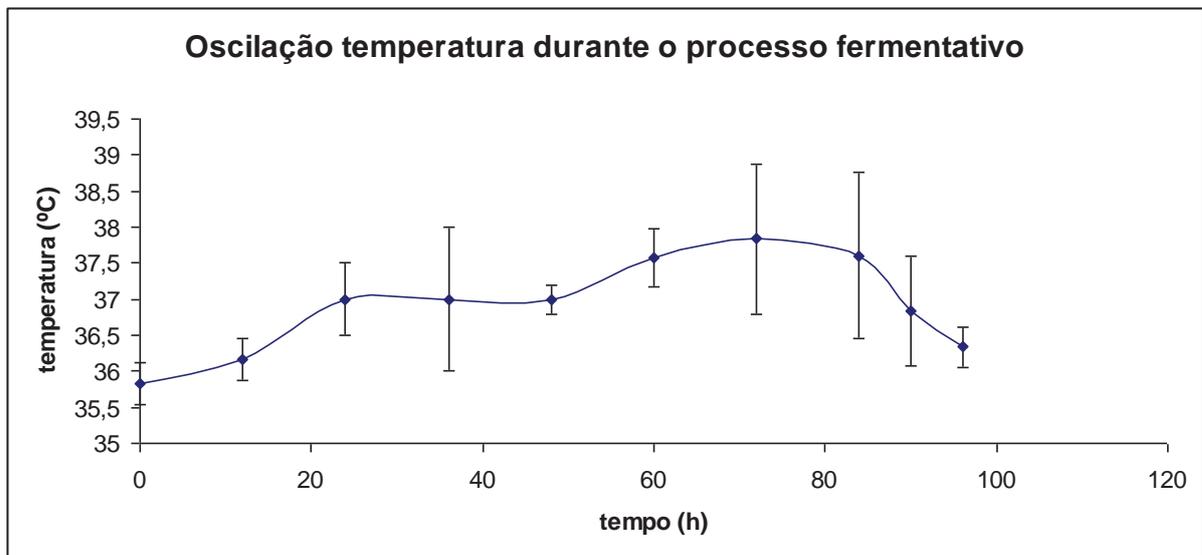


FIGURA 52 - Comportamento da temperatura durante o processo de fermentação

A produção, quando comparada a Martins et al. (2008), que utilizou um sistema de fermentação semelhante ao utilizado, que consiste em um reator de coluna para fermentação em estado sólido com os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp., obtiveram resultados superiores aos obtidos por este experimento.

De modo geral, a fermentação no biorreator de coluna obteve respostas inferiores às obtidas anteriormente, na condição estudada, o que indica que o modelo de reator pode interferir nas variáveis de processo utilizadas.

6.4.2. Biorreator de tambor rotativo

Os resultados de tensão superficial para as fermentações conduzidas no biorreator rotativo estão ilustradas na figura a seguir:

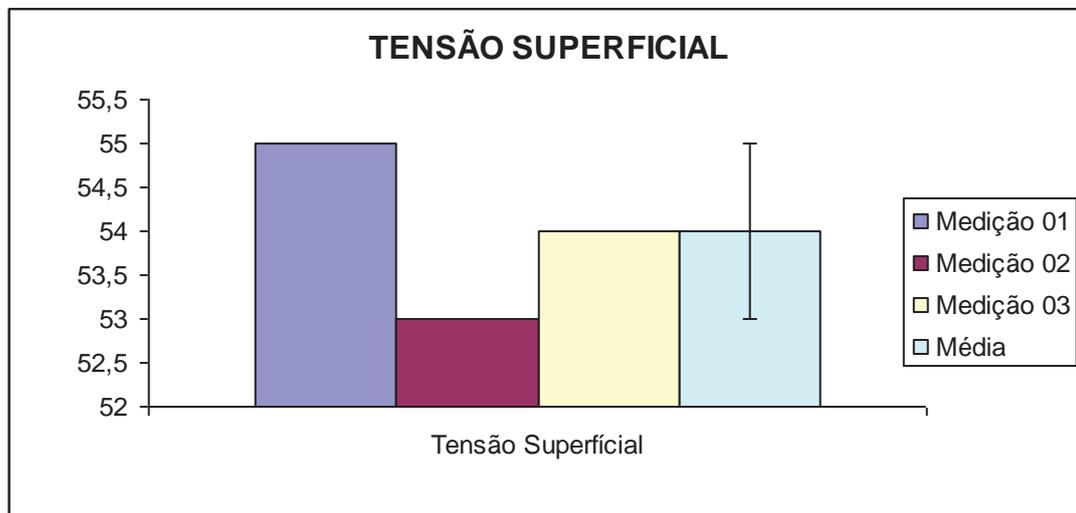


FIGURA 53 – Tensão superficial para a fermentação conduzida no biorreator rotativo

A redução de tensão superficial foi inferior à obtida por fermentação em sacos plásticos, porém similar à obtida por fermentação em reator de coluna.



FIGURA 54 – Frascos para medir índice de emulsificação

Boxplot de E24; E48; E72; E96

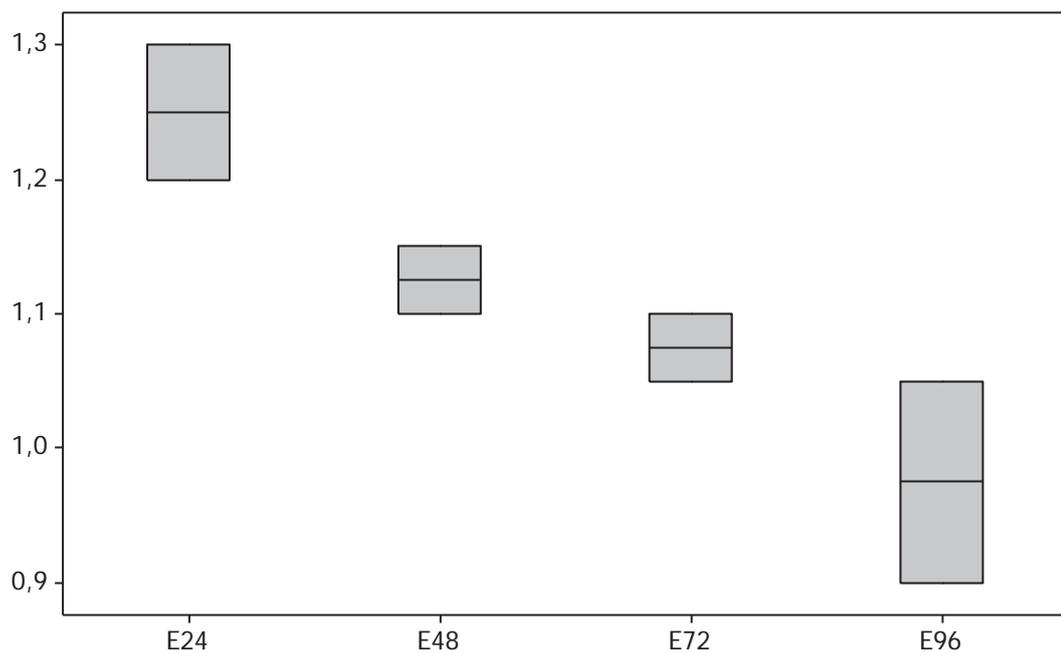


FIGURA 55– Índice de emulsificação medidos em 24, 48, 72 e 96 horas

As alturas de colunas de emulsificação obtiveram bons valores de emulsificação e estabilidade, porém inferiores aos obtidos em fermentações em sacos plásticos.

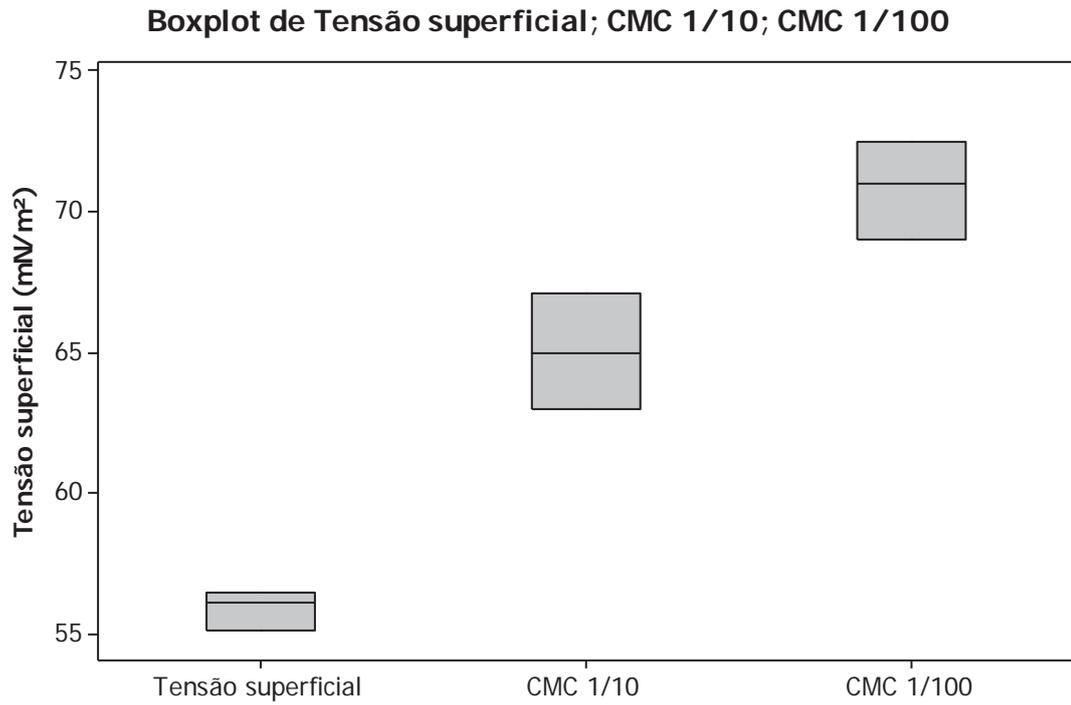


FIGURA 56 – CMC medidos em diluições de 1p/10 v/v e 1p/100 v/v

Os valores de tensão superficial, sob sucessivas diluições, se comportaram dentro do esperado pela fermentação.

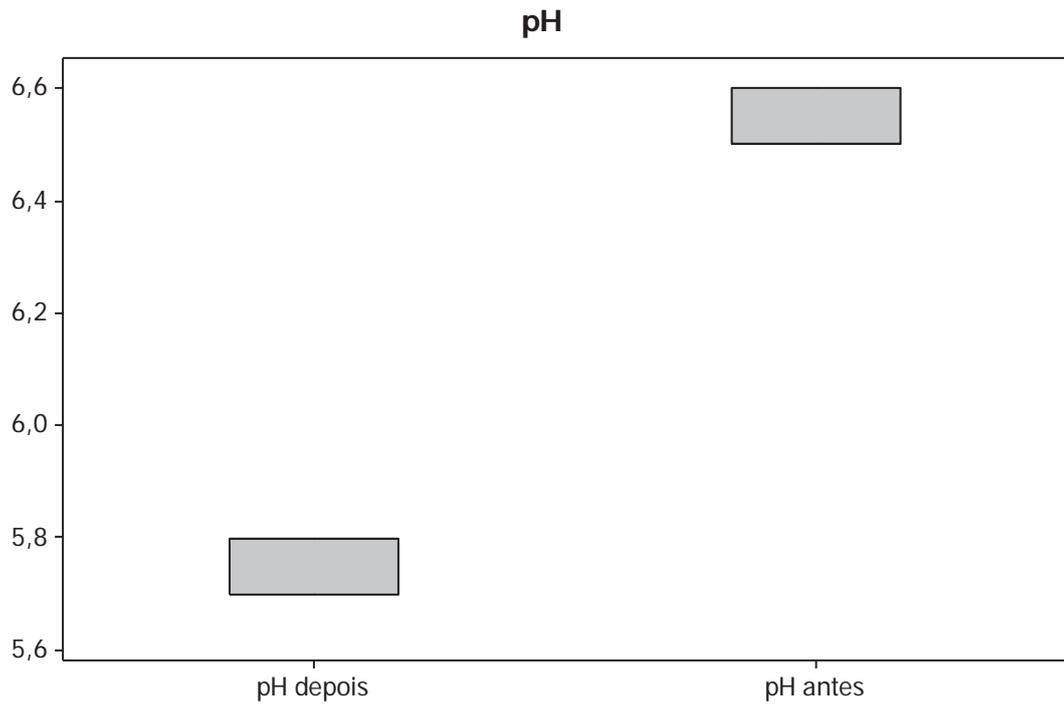


FIGURA 57 – pH medido antes e após o processo fermentativo

O pH no processo fermentativo variou em aproximadamente 1, porém dentro da faixa ótima do microrganismo.



FIGURA 58- Atividade emulsificante do biossurfactante medida em diluição 1p/100 v/v

A atividade emulsificante do biossurfactante produzido em reator rotativo apresentou uma melhora em relação ao biossurfactante produzido por reator de coluna.

A produção, comparada a Martins et al. (2008), obteve resultados inferiores comparada a atividade emulsificante. A ampliação de escala obteve resultados inferiores aos obtidos pela fermentação em sacos plásticos, porém, deve-se levar em conta que a ampliação da quantidade de substrato foi em 600%, o que pode acarretar tempos maiores de fermentação ou até mesmo inibição da produção pelo substrato.

7. CONCLUSÕES

- Houve produção de tensoativo em todos os processos fermentativos apresentados neste trabalho.
- O método de contagem de gotas pode ser usado com cautela na determinação da tensão superficial de soluções tensoativas, pois há uma forte influência da tensão superficial dinâmica sobre as medidas. Porém demonstrou ser eficaz para este tipo de análise.
- De todas as condições avaliadas de umidificação, a água residuária de laticínios demonstrou ser a mais promissora para esta produção.
- O farelo de trigo demonstrou ser o melhor substrato na produção de biossurfactantes nas condições estudadas.
- A umidade de 80% (m/m) revelou-se melhor que as demais para produção deste tensoativo nas condições propostas.
- A extração do biossurfactante do meio de cultivo pode ser feita com água fria, o que elimina etapas adicionais de purificação para biossurfactantes que são cultivados em substratos que contenham amido em sua composição.
- Os biossurfactantes, quando armazenados sob congelamento, perdem sua capacidade de formar emulsões, dentro das condições estudadas.
- A preparação do pré-inóculo demonstrou não ser necessária a este processo.
- Nas condições estudadas, a introdução do cultivo em reator de coluna com aeração forçada inferior não apresentou melhorias na produção de biossurfactantes.
- Nas condições estudadas, a introdução do cultivo em reator de tambor rotativo também não apresentou melhorias na produção de biossurfactantes.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando aperfeiçoar os resultados obtidos pelo sistema de produção descrito neste trabalho, sugerem-se alguns trabalhos futuros:

- Avaliar o ganho percentual da produção de biossurfactante pela introdução da aeração forçada no biorreator de coluna.
- Efetuar um estudo de produção de biossurfactantes em função da vazão de aeração para o biorreator de coluna.
- Avaliar o ganho percentual para produção de biossurfactante pela introdução do sistema de rotação no biorreator de tambor rotativo.
- Avaliar o desempenho de outros substratos na produção de biossurfactante.
- Avaliar a relação custo-benefício do farelo de trigo frente a outros substratos a serem estudados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A.S. Isolation of biosurfactant-producing Bactéria: production, characterization and deviation. *Acta Biotechnologica*, v. 11, n. 4, p. 315-324, 1991.

ADAMSON, A.W.; GAST, A.P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6 ed. New York: Wiley-Interscience, 1997.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, v. 31, p. 488. 1968.

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

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.28 p. 979-985, 2008.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* v. 32, p. 273–280. 1998.

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

BUENO, G.F.; AQUINO, P.L.M.; GARCIA-CRUZ, C.; DEL BIANCHI, V.L. Influência da umidade na produção de biossurfactante em fermentação em estado sólido. Anais SINAFERM. Caxias do Sul –RS, 2011

BUENO, S.M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo, Tese de Doutorado, UNESP, 89p. 2008.

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

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, p. 292-295, 2009.

COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. Vetor, v. 13, p. 85-103, 2003

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. Applied and Environmental Microbiology., v. 42, p. 408. 1981.

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, UNICAMP., 87 p. 2005.

DEL BIANCHI, V.L., MORAES, I.O., CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido, in: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial, v.3, Edgard Blücher, São Paulo, 2001

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.61, p.47. 1997

ESMERALDO, F.S. Influência da Temperatura na Produção de Surfactina por *Bacillus Subtilis* Lami005, Monografia, UFC, 42 p. 2010.

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

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

JOHNSON, B. H.; HECHT, M. H. Recombinant Proteins Can Be Isolated from E. coli Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. Bio/Technology, New York, v.12, p.1357-1360, 1994.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.J. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9.,J. Ferment. Bioeng. v. 84, p. 41, 1997.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. FEBS Lett., v. 231, p. 107, 1988.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANK, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105, J. Colloid Interface Sci. v. 204 p. 1–8. 1998

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid Interface Science, v. 7, n 1-2, p. 12-20, 2002.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. Bioresource Technology, v.87, n.2, p.167-198, 2003.

LIDE, D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88th Edition; CRC, 2007.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 18, n. 1, p. 37-42, 1997.

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

MONTEIRO, L. Produção de Substâncias Bioativas de *Bacillus spp.* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Tese de Mestrado, UFPE, 63 p. 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772-776. 2003

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactante production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.* v. 35, 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006

OLIVEIRA, J.G. Produção de Biosurfactante por *Bacillus Pumilus* e Avaliação da Biorremediação de Solo e Água Contaminados com Óleo, Tese de Mestrado, UNESP, 67 p., 2010.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.

PONTES C. R., Enriquecimento Protéico do Bagaço de Caju Através de Fermentação Semi-Sólida Utilizando *Aspergillus niger*. Tese de Mestrado, UFC, 71 p. 2009.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.3, 1998.

ROSEN, M.J.; LI, F.; MORRAL, S.W.; VERSTEEG, D.J. The relationship between the interfacial properties of surfactants and their toxicity to aquatic organisms. *Environ. Sci. Technol.*, v. 35, p. 954. 2001.

RUIZ-GARCIA, C.; BEJAR, V.; MARTINEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v. 55, p.191–195 Spain, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIAT I S, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*: 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.

TEIXEIRA NETO, E. ; MALTA, M.M. ; DOS SANTOS, R.G. Medidas de Tensão Superficial Pelo Método de Contagem de Gotas: Descrição do método e experimentos com tensoativos não-iônicos etoxilados. *Química Nova*, v. 32, p. 223-227, 2009.

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

YAKHNIN, A. V.; VINOKUROV, L. M.; SURIN, A. K.; ALALHOV, Y. B. Green fluorescent protein purification by organic extraction. Protein Expression Purif., Orlando, v.14, p.382-386, 1998.