UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RENARA KARINY SANTOS DE MORAIS

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

RENARA KARINY SANTOS DE MORAIS

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Karla de Souza Abud

Catalogação na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Fabiana Camargo dos Santos

M827p Morais, Renara Kariny Santos de.

Produção de biossurfactantes a partir de substratos de baixo custo / Renara Kariny Santos de Morais. -- 2012.

130 f.: il., tabs. e grafs.

Orientadora: Ana Karla de Souza Abud.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 117-130.

1. Resíduos agroindustriais. 2. Biossurfactantes. 3. Biodegradação.

4. Análise por componentes principais (ACP). I. Título.

CDU: 663.18

Renara Kariny Santos de Morais

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química

Aprovada em: Maceió, 15 de Março de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Karla de Souza Abud (PPGEQ/UFAL – Orientadora)

Prof^a. Df^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (PPGEQ/UFAL)

Prof. Dr. Antônio Martins de Oliveira Junior (UFS- Membro Externo)



Aos meus pais, Raíssa, Rebecca, Iza e Paulinho como demonstração do meu amor incondicional que transpõe qualquer distância.

AGRADECIMENTOS

A Deus, hoje e sempre, pelo discernimento e a sensibilidade que me concedeste para tamanha grandeza e por ter posto pessoas tão maravilhosas em meu caminho que fizeram e fazem toda a diferença. Obrigada Senhor por ter me permitido chegar até aqui.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Departamento de Engenharia Química, pela formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

À Prof.^a Ana Karla de Souza Abud, minha orientadora, a quem sou muito grata pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência e, principalmente, pelo norteamento que me foi dado. Muito obrigada.

A todos os professores do curso, cujos valiosos ensinamentos transmitidos, a paciência, a dedicação e o apoio foram fundamentais para a transposição desta etapa de vida, em especial aos professores Wagner Roberto de Oliveira Pimentel e Antônio Osimar Sousa da Silva.

Ao Prof. Frede de Oliveira Carvalho e a Ana Maria Ribeiro pela contribuição valorosa no trabalho e a atenção concedida.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), peça fundamental para a execução da conclusão deste trabalho, pelo abrigo cedido e pela ajuda e compreensão. Obrigada Prof. Roberto Rodrigues de Souza, Anita, Jacqueline e Silvanito e Prof. Jorge José de Brito Silva.

Aos meus eternos amigos e companheiros diários de laboratório, fontes de aprendizado, alegrias incontáveis, inquestionáveis momentos e ombros mais que amigos: Brígida, Cadu, Jânio, Natan, Micaela e, em especial, Lucynei.

À minha querida amiga Margarete Cabral pelo apoio, amizade e ajuda que nunca me foram negados.

Ao David que sempre me recebeu prontamente na secretária.

Ao Bira, Deyse e suas funcionárias, fontes de energia pro meu dia.

A todos os colegas do curso, pela amizade, pelos momentos de descontração, pela ajuda nos momentos mais críticos, em especial os momentos intensos em que eu tinha que esquecer que a palavra saudade não pode tomar conta de mim. Meus amigos, foram com vocês as horas mais que especiais que vivi no decorrer desses dois anos. Aos meus companheiros e companheiras meus gratos e eternos agradecimentos: Ariane, Eleny, Jeilma, Prazeres, Cássia, Lucynei, Bruno, Tiago, Jailson e Lúcio.

Ao meu pai Augusto e minha mãe Do Carmo, pelo imenso amor dedicado, pelo apoio incansável, incondicional e imensurável. Amo demasiadamente. Por vocês e com vocês todas as minhas vitórias valem a pena e todas as minhas derrotas são insignificantes.

Aos meus sobrinhos Raíssa Kariny, Rebecca Vitrhória, Iza Maria e Paulo Augusto, por alegrarem a minha vida com suas existências e que me deram forças a cada dia.

Aos meus irmãos Jorge e Júnior, que me deram os melhores presentes da minha vida, muito obrigada.

Ao meu tio Jorge e a minha tia Rosário pelo carinho mais que especial.

Aos meus tios, Liduína, Nicodemos, Bita, Manoel (*in memorian*), Lenita, Glória. Em especial ao meu querido Tio Jeová, Vó Maria Alves e Cacainha (*in memorian*) e todos os primos, os momentos foram poucos, mas o suficiente pra se ter carinho.

À Dona Ducarmo, seu Manoel e Clodoaldo, obrigada pela amizade sincera e acolhedora, e pela eterna vizinhança.

À Ana Amélia, Aracelli, Tânia e Nouga agradeço pela oportunidade, pela credibilidade e pelos valiosos e preciosos sentidos da minha vida acadêmica.

À Natália pelas variadas vezes que me mostra a distância o valor da amizade verdadeira.

À Dona Socorro, Seu Manoel e a toda família Lima pela receptividade amorosa.

Aos meus queridos amigos alagoanos conquistados e preservados. À Dona Lanusia, seu Olinto e Diego Lucas pelo apoio e momentos vividos.

À Dona Maristela e sua enorme família por me fazer sentir verdadeiramente em casa, em especial a amiga Rose pela diversão e os cuidados maternos.

À minha amiga Angélica pela irmandade eterna, pelo carinho, pela compreensão, pela amizade, pelas lutas, por ter feito da minha complexidade a minha simplicidade. Valeu por ter você!

À Maceió, minha sereia.

RESUMO

Devido a gama de utilizações na indústria petrolífera, em produtos de higiene e cosméticos, mineração, agricultura, farmacêutica, papel e celulose, têxtil e cerâmica, os biossurfactantes vêm sendo amplamente pesquisados, motivados pela forte tendência de substituição dos produtos sintéticos por biológicos em aplicações industriais e ambientais. O fato dos microorganismos suportarem desde condições ambientais mais adversas às amenas e serem encontrados em vários tipos de substratos, os tornam produtores de diversos biossurfactantes, com variadas aplicabilidades, potenciais de toxicidade e biodegradabilidade bem menores que os surfactantes sintéticos. O presente estudo objetivou isolar, selecionar e caracterizar bactérias, bolores e leveduras a partir de resíduos agroindustriais como vinhaça, manipueira e óleo residual de fritura. Dos micro-organismos isolados foi estudado o potencial de produção de moléculas de biossurfactantes, por teste de biodegradabilidade, em concentrações de 0,2 a 1% de petróleo, na presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Após seleção, avaliou-se a capacidade de produção de biossurfactantes e formação de emulsões em petróleo, quando comparadas a um surfactante sintético como o lauril sulfato de sódio (SLS®), quantificação da tensão superficial e a submissão dessas moléculas à biorremediação do petróleo in situ. Dos resultados iniciais, 50 micro-organismos foram isolados, dos quais 32 mantiveram viabilidade celular. Destes, 17 micro-organismos foram provenientes da manipueira, 5 da vinhaça e 10 do óleo residual de fritura. Para o teste de biodegradabilidade, verificou-se que 35% dos micro-organismos provenientes da manipueira degradaram percentuais de 0,2 e 0,6% de petróleo e 20% dos micro-organismos da vinhaça e 30% dos provenientes do óleo de fritura residual também degradaram as mesmas concentrações de fonte oleosa, chegando alguns a degradar até 1% de petróleo após 4 horas de avaliação. O processo fermentativo com óleo residual de fritura e manipueira como substratos apresentaram maiores índices de reduções na tensão superficial da água e percentual de biorremediação de petróleo em areia de praia contaminada em cerca de 81%, quando comparados com fontes de carbono como a vinhaça e a glicose.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Biossurfactantes. Biodegradação. ACP.

ABSTRACT

Due to the range of uses in the oil industry, hygiene products and cosmetics, mining, agriculture, pharmaceutical, paper and pulp, textiles and ceramics, the biosurfactants have been widely studied, motivated by the strong tendency in replace synthetic to biological products in industrial and environmental applications. The fact of the microorganisms withstand the most adverse environmental conditions from the mild and are found in various types of substrates, become producers of a range of biosurfactants with diverse applicability, potential toxicity and biodegradability smaller than the synthetic surfactants. This present study aimed to isolate, select and characterize bacteria, molds and yeasts from agroindustrial wastes as vinasse, manipueira and residual oil of frying. The micro-organisms isolated, were studied the potential for producing molecules of biosurfactants, test for biodegradability in concentrations of 0.2, 0.6 and 1% of oil in the presence of redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP). After selection, it was evaluated the capacity to produce biosurfactants and oil emulsion formation when compared to a synthetic surfactant such as sodium lauryl sulfate (SLS®), measuring the surface tension and submission of these molecules in situ bioremediation of petroleum. Of the initial results, 50 micro-organisms were isolated, of which 32 maintained cell viability. Of these, 17 microorganisms were from manipueira, 5 of vinasse and 10 of the residual oil for frying. To test for biodegradability, it was found that 35% of microorganisms from manipueira degraded percentages of 0.2 to 0.6% of oil and 20% of microorganisms of vinasse and 30% of these from oil for frying also degraded the same concentrations of oil supply, degraded some even up to 1% of oil after 4 hours of evaluation. The fermentation process when the residual oil for frying and manipueira as substrates had higher rates of reductions in surface tension of water and percentage of oil bioremediation in beach sand contaminated with, about 81%, when compared to the other sources of carbon as vinasse and glucose.

Keywords: Agroindustrial wastes. Biosurfactants. Biodegradation. PCA.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 | Representação esquemática dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos do surfactante. | 30 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2 | Representação esquemática de como os surfactantes atuam para a redução interfacial dos líquidos. | 33 |
| Figura 3 | Representação esquemática do comportamento de um surfactante em solução após a CMC. | 35 |
| Figura 4 | Tipos de estrutura de surfactantes em solução. | 36 |
| Figura 5 | Diagrama esquemático da variação da tensão superficial e solubilidade em função da concentração de surfactante (CMC – representa a concentração micelar crítica). | 37 |
| Figura 6 | Estrutura de ramnolipídeo de <i>Pseudomona aeruginosa</i> . | 38 |
| Figura 7 | Estrutura molecular de soforolipídeo de <i>Candida</i> (Torulopsis) bombicola. | 39 |
| Figura 8 | Estrutura do trealolipídeo produzido por <i>Rhodococcus erythropolis</i> . | 40 |
| Figura 9 | Estrutura de fosfatidiletanolamina de $Acinetobacter$ sp R_1 e R_2 são cadeias de hidrocarbonetos. | 41 |
| Figura 10 | Ácido corinomicólico de Corynebacterium sp. R1 e R2 são grupamentos alquílicos. | 41 |
| Figura 11 | Estrutura de Emulsan de Acinetobacter calcoaceticus. | 42 |
| Figura 12 | Microplaca tipo ELISA. | 63 |
| Figura 13 | Curva de calibração da concentração de células. | 66 |
| Figura 14 | Curva de calibração de glicose. | 68 |
| Figura 15 | Curva de calibração de BSA. | 69 |
| Figura 16 | Casa de farinha, extração da manipueira e caixa de armazenamento. | 75 |
| Figura 17 | Visualização de colônias desenvolvidas após o estriamento e | 77 |

viabilidade celular.

| Figura 18 | Visualização microscópica de alguns micro-organismos encontrados no isolamento no aumento de 400x. | 80 |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19 | Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da manipueira, após 2 horas do teste de biorremediação. | 81 |
| Figura 20 | Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da manipueira, após 4 horas do teste de biorremediação. | 81 |
| Figura 21 | Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da vinhaça (da numeração de 22 a 31) e de óleo residual de fritura (da numeração 33 a 50), após 4 horas do teste de biorremediação. | 82 |
| Figura 22 | Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da vinhaça e de óleo residual de fritura, após 4 horas do teste de biorremediação. | 83 |
| Figura 23 | Teste do Colapso da gota. | 85 |
| Figura 24 | Produção de biossurfactante. | 86 |
| Figura 25 | Percentual da redução de AR nos meios de glicose e glicose + óleo. | 87 |
| Figura 26 | Cinética de crescimento celular das amostras 2, 3, 5, 7, 10, 13 e 17, tendo a glicose como substrato. | 88 |
| Figura 27 | Cinética de crescimento celular das amostras 25, 33, 35, 43, C2, C9 e C10 tendo a glicose como substrato. Fonte: Autor. | 89 |
| Figura 28 | Percentual da redução de AR nos meios de vinhaça, vinhaça + óleo e vinhaça + manipueira. Fonte: Autor. | 91 |
| Figura 29 | Percentual da redução de AR nos meios de manipueira, manipueira + óleo e vinhaça + manipueira. | 92 |
| Figura 30 | Percentual da redução de ART em diferentes fontes alternativas suplementados ao meio mineral. | 94 |
| Figura 31 | Concentração de proteína ao final do processo fermentativo, em | 96 |

diferentes meios de cultura.

| Figura 32 | Gráfico da estabilidade da emulsão (%) em querosene. | 101 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 33 | Gráfico da estabilidade da emulsão (%) em hexano. | 102 |
| Figura 34 | Etapas do processo de biorremediação com areia de praia contaminada com petróleo. | 104 |
| Figura 35 | Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes e SLS^{\otimes} na concentração de 1,5% (v/v) em meios de glicose e óleo + glicose. | 105 |
| Figura 36 | Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes e SLS^{\otimes} na concentração de 1,5% (v/v) em meios de vinhaça, óleo + vinhaça e vinhaça + manipueira. | 106 |
| Figura 37 | Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes e SLS^{\otimes} na concentração de 1,5% (v/v) em meios de manipueira, óleo + manipueira e vinhaça + manipueira. | 106 |
| Figura 38 | ACP das amostras avaliadas no estudo. | 110 |
| Figura 39 | ACP dos parâmetros avaliados no estudo. | 112 |
| Figura 40 | ACP: representação das amostras conforme suas fontes de carbono. | 112 |
| Figura 41 | Representação das amostras conforme suas fontes de carbono. | 113 |

LISTA DE QUADROS

| Quadro 1 | Estruturas de alguns surfactantes de acordo com a classificação de | | | | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------|----|--|--|--|--|
| | suas cargas predominantes no grupo hidrofílico. | 31 | | | | |
| Quadro 2 | Classificação dos biossurfactantes de acordo com a massa molecular. | 43 | | | | |
| Quadro 3 | Tensão superficial e CMC de biossurfactantes e surfactantes. | 47 | | | | |
| Quadro 4 | Toxicidade de biossurfactantes comparada aos surfactantes | | | | | |
| | sintéticos. | 47 | | | | |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1 | Composição química (g/L) dos meios de cultura usados no estudo. | 61 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tabela 2 | Caracterização físico-química da vinhaça e comparação com a literatura. | 7 4 |
| Tabela 3 | Caracterização físico-química da manipueira obtida da variedade de mandioca Sergipana. | 75 |
| Tabela 4 | Caracterização físico-química do óleo residual de fritura e comparação com a literatura. | 76 |
| Tabela 5 | Caracterização dos micro-organismos isolados a partir dos resíduos em estudo. | 78 |
| Tabela 6 | Concentração celular ao final do processo fermentativo, em meio mineral suplementado com glicose. | 89 |
| Tabela 7 | Teor de sólidos solúveis em caldos fermentativos suplementados com diferentes fontes de carbono. | 95 |
| Tabela 8 | Tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes obtidos após o crescimento dos isolados em diferentes fontes de carbono após sete dias à 30°C e 110rpm. | 97 |
| Tabela 9 | Atividade de emulsificação de querosene e hexano (%) em diferentes concentrações salinas com alguns biossurfactantes obtidos no estudo e | |
| | com SLS [®] , no início e ao final de 24 horas de contato. | 103 |
| Tabela 10 | Desempenho dos biossurfactantes em relação ao tipo de micro- organismo em meio suplementado com óleo de fritura e manipueira. | 108 |
| Tabela 11 | Contribuição numérica de cada parâmetro nas CP1 e CP2. | 111 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% Porcentagem

μL Microlitros

A Absorvância

ACP Análise por Componentes Principais

AE0,5Q Atividade da de emulsificação a concentração salina de 0,5% em querosene

AE15,0H Atividade da de emulsificação a concentração salina de 15,0% em hexano

AE2,5Q Atividade da de emulsificação a concentração salina de 2,5% em querosene

AE5,0Q Atividade da de emulsificação a concentração salina de 5,0% em querosene

AN Ágar nutriente

AR Açúcar redutor

ART Açúcar redutor total

AS Ágar Sabourad

B Biorremediação

CaCl₂.2H₂O Cloreto de cálcio bi-hidratado

CE₅₀ Concentração efetiva

cél/mL Células por mililitros

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cm Centímetros

CMC Concentração Micelar Crítica

CMD Diluição Micelar crítica

CP Componentes Principais

CP1 Componente principal 1

CP2 Componente principal 2

DAB Dodecildimetil amônio buriato

DBO Demanda Biológica de Oxigênio

DCPIP Indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol

DDT Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DNS Ácido Dinitrosalicílico

DTAB Brometo de dodeciltrimetil amônio

EE Estabilidade da emulsão

EEH Estabilidade da emulsão em hexano

EEQ Estabilidade da emulsão em querosene

FAOSTAT-

FAO Food And Agriculture Organization Of The United Nations

FDA Food and Drug Administration

Fe Ferro

FT-IR Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier

G Glicose

g/L Gramas por litro

GRAS Generally Recognized as Safe

HLB Balanço Hidrofílico-Lipofílico

KH₂PO₄ Fosfato ácido de potássio

KOH Hidróxido de potássio

LC/MS Cromatografia Líquida/ Espectrometria de Massa

LEEQ Laboratório de Ensino de Engenharia Química

M Manipueira

m³ Metro cúbico

MEOR Recuperação melhorada do petróleo

Mg Magnésio

mg/L Miligrama por litro

MgSO₄.7H₂O Sulfato de magnésio hepta-hidratado

Ml Mililitro

MM Meio Mineral

Mn Manganês

mN/m MetroNewton por metro

N Nitrogênio

Na₂HPO₄ Fosfato bibásico de sódio

NaCl Cloreto de sódio

NH₄Cl Cloreto de amônio

Nm Nanômetros

°BRIX Sólidos solúveis

°C Graus Celsius

OG Óleo + Glicose

OM Óleo + Manipueira

OV Óleo + Vinhaça

P Fósforo

P Proteína

PDA Ágar Batata Dextrosado

pH Potencial hidrogeniônico

PPM Partes por milhão

RMN Ressonânica Magnética Nuclear

RPM Rotação por minuto

S Estanho

SLS Lauril sulfato de sódio

SS Sólidos solúveis

TLC Cromatografia de Camada Fina Analítica

TS Tensão superficial

UFAL Universidade Federal de Alagoas

US\$ United States dólar

V Vinhaça

VM Vinhaça + Manipueira

 $V_{\rm o}$ Volume do meio de cultivo

X Concentração de células

 X_{m} Concentração da amostra

YL Yarrowia lipolytica

SUMÁRIO

| 1 INTRO | ODUÇÃO | ••••• | | | | | ••••• | | |
|-----------------|-------------------|-------------|------------|-----------------------------------------|--------|------------|--------|-----------------------------------------|---------|
| 2 REVIS | SÃO DE LITE | RATUR | A | | | ••••• | | | |
| 2.1 Resíd | duos agroindus | triais | ••••• | | | | ••••• | | |
| 2.1.1 Ma | nipueira | | | ••••• | ••••• | | | | |
| 2.1.2 Vin | nhaça | | ••••• | ••••• | ••••• | | | ••••• | |
| 2.1.3 Óle | eo Residual de F | ritura | | | ••••• | | | | |
| 2.2 Bio | ossurfactante | como | alterna | ativa | de | tratame | nto de | re | esíduos |
| agroindı | ustriais | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | | ••••• | ••••• | |
| 2.3 Surfa | actantes | | | | | | | | |
| 2.3.1 Ter | nsão superficial. | | | | | | | ••••• | |
| 2.3.2 Co | ncentração Mice | elar Crític | ca | | | | | | |
| 2.4 Bioss | surfactantes | | | ••••• | ••••• | | | | ••••• |
| 2.4.1 Pro | priedades espec | cíficas | | | ••••• | | | | |
| 2.4.2 Caı | racterização e qu | uantificaç | ção | | | | | ••••• | |
| 2.4.3 Pro | odução | | | | | ••••• | | ••••• | |
| 2.4.4 Ap | licação | ••••• | ••••• | | | | | ••••• | |
| 2.4.4.1 B | Biorremediação | | | | ••••• | | | ••••• | |
| 2.4.4.2 L | impeza de resei | vatórios | de óleo. | ••••• | ••••• | | | ••••• | |
| 2.4.4.3 R | Recuperação mel | lhorada d | le petróle | eo | ••••• | | | | ••••• |
| 2.5 Isola | amento e carac | terização | o de mic | ro-or | ganisn | nos | | | ••••• |
| 2.6 Anál | ise por compor | nentes pr | incipais | (ACI | P) | | | | |
| 3. OBJE | TIVOS | ••••• | | • • • • • • • • • • • • • • • • • • • • | | | | | |
| 3.1 Obje | etivos gerais | | | | | | ••••• | · • • • • • • • • • • • • • • • • • • • | |
| 3.2 Obje | etivos específico | os | | | ••••• | | | | |
| 4. MET(| ODOLOGIA | | | | | | | | |
| 4.1 | Crescimentos, | isolan | nento | e | cara | cterização | o dos | S | micro- |

| organism | 10S | ••••• | | | ••••• | | | |
|-------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------|--------|-------|--------------|
| 4.2 Teste | de biodegradal | oilidade | ••••• | | | | | |
| 4.3 Obten | ıção e caracter | ização físic | o-química dos | resíduos | s | | | |
| 4.3.1 Dete | erminação do pI | ł | | | | | | ••• |
| 4.3.2 Dete | erminação dos s | ólidos solúv | veis | ••••• | | ••••• | | ·••• |
| 4.3.3 Dete | erminação da Do | QOOŞ | | | | | | |
| 4.3.4 Dete | erminação de ni | rogênio tot | al | | | | | |
| 4.3.5 Dete | erminação do ín | dice de acid | lez | | | | | |
| 4.3.6 Dete | erminação do ín | dice de sapo | onificação | ••••• | | | | |
| 4.3.7 Dete | erminação da de | nsidade | | | | | | ••• |
| 4.4 Produ | ıção de biossur | facantes | | | | | | |
| 4.4.1 Dete | erminação da co | ncentração | celular | | | | | |
| 4.4.2 Dete | erminação dos a | çúcares | | | | | | •••• |
| 4.4.3 Dete | erminação do te | or de sólido | s solúveis | | | | | |
| 4.4.4 Dete | erminação da co | ncentração | de proteínas | | | | | |
| 4.4.5 Dete | erminação do ín | dice de emu | ılsificação | | | | | |
| 4.4.6 Dete | erminação da te | nsão superf | icial | | | | | •••• |
| 4.5 Utiliz | zação dos resí | duos agro | industriais de | manip | ueira, | vinhaç | a e ó | leo |
| residual | de fritura | | substratos | para | a | produ | , | de |
| biossurfa | ctantes | | | | ••••• | | ••••• | •••• |
| 4.5.1 Trata | amento de resíd | uos | ••••• | ••••• | | | | •••• |
| 4.6 Isolan | nento dos bioss | urfactante | S | ••••• | | ••••• | | · ··· |
| 4.7 Poten | cial para biorr | emediação | | | | | | |
| 4.8 Anális | se de componei | ıtes princij | pais (ACP) | | | | | •••• |
| 5 RESUL | TADOS E DIS | CUSSÕES | J | | | | | •••• |
| 5.1 Carac | cterização físico |)-química (| dos resíduos a | groindus | triais | | | |
| 5.1.1 Vinl | 1aca | | | | | | | |

| 5.1.2 Manipueira | 74 |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.3 Óleo residual de fritura | 75 |
| 5.2 Isolamentos, crescimento e caracterização dos micro-organismos | 77 |
| 5.3 Peste de biodegradabilidade | 81 |
| 5.4 produção de biossurfactante | 84 |
| 5.4.1 Determinação de açúcares redutores (AR) | 86 |
| 5.4.1.1 Glicose | 86 |
| 5.4.1.2 Vinhaça | 90 |
| 5.4.1.3 Manipueira | 91 |
| 5.4.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART) | 93 |
| 5.4.3 Determinação de sólidos solúveis (°BRIX) | 94 |
| 5.4.4 Determinação da concentração de proteínas nos biossurfactantes | 95 |
| 5.4.5 Determinação da tensão superficial | 96 |
| 5.4.6 Determinação da atividade de emulsificação | 100 |
| 5.5 Produção para biorremediação | 104 |
| 5.6 Desempenho dos biossurfactantes de acordo com o tipo de micro- organismo. | 107 |
| 5.7 Isolamento dos biossurfactantes | 110 |
| 5.8 Análise por componenetes principais (ACP) | 110 |
| 6. CONCLUSÃO | 115 |
| 7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS | 116 |
| 8. REFERÊNCIAS | 117 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, em especial a região Nordeste, possui uma economia baseada na produção agrícola. Isto resulta em grandes volumes de resíduos, que devem ser adequadamente dispostos ou tratados, uma vez que o seu acúmulo gera a deterioração do meio ambiente e a perda de recursos, com significativa contribuição para o problema da reciclagem e da conservação da biomassa. Vários processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para utilizar tais resíduos na produção de biocombustíveis, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e biossurfactantes, gerando produtos de grande valor econômico, agregando valor a um produto de descarte e possibilitando fonte de renda alternativa, cumprindo, assim, função ambiental e social. Por sua disponibilidade, baixo custo e necessidade de escoamento, os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como fonte de isolamento ou substrato para micro-organismos no processo de produção de biossurfactantes (ROSSMANN, 2008).

Os biossurfactantes, também chamados tensoativos de origem microbiana, têm sido uma alternativa viável aos tensoativos sintéticos, apresentando como vantagens a biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de atuar em condições mais drásticas de temperatura, salinidade ou pH. São aplicados em sistemas de controle de poluição do meio ambiente por derramamento de petróleo e seus derivados, visto que aumentam a biodisponibilidade dos contaminantes e, também, incrementam a produção de poços de petróleo, limpeza de tanques, fabricação de películas ultrafinas, processamento químico de papel, etc. (DESAI; BANAT, 1997).

Substratos agroindustriais renováveis e de baixo custo, com elevado valor de carboidratos ou lipídeos, têm despertado grande interesse dos pesquisadores na produção de biossurfactantes como, por exemplo, a produção a partir de leveduras, pelo fato de possuírem a classificação GRAS (Generally Recognized As Safe) do FDA (Food and Drug Administration), que permite o uso de seus metabólitos nas mais diversas cadeias produtivas, como químicas, alimentos, cosmética e farmacêutica, pois não apresentam toxicidade e patogenicidade (BARTH, 1997).

Além das leveduras, vários outros micro-organismos, como bactérias e bolores, possuem capacidade de produzir moléculas com atividade interfacial, sendo interessante identificar, isolar e selecionar os micro-organismos produtores dessas moléculas com propriedades tensoativas (DESAI; KOTECHA; SALUNKE, 1997).

A preocupação em se optar cada vez mais pelo uso de surfactantes biológicos e obtêlos a partir de resíduos agroindustriais se deve à crescente demanda pelos tensoativos. Além disto, há o fato de a maioria dos surfactantes sintéticos comercialmente disponíveis serem sintetizados a partir de derivados do petróleo, sendo tóxicos para diferentes organismos e não prontamente biodegradáveis. Assim, os biossurfactantes estão sendo amplamente explorados também como forma de acompanhar a tendência de substituição dos produtos sintéticos por biológicos em aplicações industriais e ambientais (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2006).

Os biossurfactantes são produzidos por uma ampla variedade de micro-organismos, genericamente classificados como sendo de baixo ou alto peso molecular (DESAI; BANAT, 1997; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998). Os biossurfactantes de baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos ou lipopeptídeos, enquanto os de alto peso molecular são polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

O interesse pelos biossurfactantes tem aumentado em função de sua diversidade, da possibilidade de sua produção por processo de fermentação e do seu potencial de aplicação na limpeza de ambientes contaminados com diferentes tipos de poluentes e na recuperação do óleo cru.

O tipo, a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por um microorganismo são influenciados por fatores tais como a natureza da fonte de carbono, as concentrações de nutrientes como N, P, Mg, Fe, S e Mn no meio e as condições de crescimento, tais como pH, temperatura, agitação e concentração de oxigênio disponível.

Por conta das necessidades nutricionais e físicas dos surfactantes biológicos é que se tem a opção de se utilizar resíduos agroindustriais, em função de seus altos níveis de carboidratos ou lipídeos, suprindo a necessidade de fonte de carbono para a produção desses metabólitos pelos micro-organismos (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

Makkar e Cameotra (1998) citam que a utilização de resíduos agroindustriais tem o empecilho da dificuldade de padronização por conta das variações naturais dos processos de decomposição que são conferidos aos mesmos, os custos de transporte, o armazenamento e o tratamento prévio. Todavia, o baixo custo é compensador em relação aos custos de produção para surfactantes sintéticos, pois é um dos principais fatores a ser considerado no

desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico, além de contribuir enormemente para a minimização dos problemas ambientais.

A caracterização dos biossurfactantes e os requerimentos físico-químicos para a sua produção têm sido objetos de vários estudos. Assim, os objetivos deste trabalho foram isolar, selecionar e caracterizar micro-organismos a partir de amostras ambientais com potencial de produção de moléculas biossurfactantes, utilizando-se de resíduos agroindustriais como manipueira, vinhaça e óleo residual de fritura e ensaios de fermentação para verificar o índice de emulsificação, caracterizando-os quanto à capacidade de formar emulsões em petróleo, além de determinar o efeito da salinidade e temperatura na atividade dos biossurfactantes produzidos, testes de biodegradabilidade para uso posterior em ensaios de biorremediação e estudos da redução da tensão superficial dos biossurfactantes gerados.

Este trabalho é apresentado da seguinte maneira. No tópico 2 são abordados aspectos da problemática ambiental que se tem devido ao descarte e/ou tratamento inadequado de resíduos agroindustriais, definições e características dos resíduos agroindustriais estudados, bem como as alternativas de tratamento para esses resíduos. Apresentam-se, também, aspectos relacionados aos surfactantes e suas propriedades, bem como as vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes sintéticos, aplicações industriais e ambientais. No tópico 3 são apresentados os objetivos alcançados ao longo do trabalho. No tópico 4, apresenta-se a metodologia de estudo, do isolamento de micro-organismos, seleção para a capacidade de biodegradar à produção de biossurfactantes e aplicação em ambientes contaminados com hidrocarbonetos para a biorremediação. No tópico 5 seguem os resultados e a discussão dos experimentos relacionados com o isolamento, crescimento, caracterização morfológica e bioquímica dos micro-organismos, teste de biodegradabilidade em diferentes concentrações de petróleo e caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais. No tópico 6 são apresentadas as principais conclusões alcançadas no trabalho. No tópico 7 são pontuadas as perspectivas para trabalhos futuros. Por fim, são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas neste estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos agroindustriais

Com a crescente necessidade de se obter regiões e populações cada vez mais desenvolvidas, por conta da exigência competitividade de mercado global, a indústria passou a utilizar toda e qualquer matéria para o beneficiamento de bens de consumo que tragam, em curto prazo, produtos que venham acoplados com sinônimo de desenvolvimento.

Consequentemente, a produção acelerada traz consigo a geração de resíduos agroindustriais, os quais prejudicam enormemente o meio ambiente por conta do seu armazenamento ou descarte inadequado. E, a partir da constatação do dano ecológico, o grande desafio da humanidade é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental, por conta da preocupação cada vez mais frequente com o meio ambiente (PINTO, 2005).

Políticas ambientais norteadas por órgãos governamentais, e até mesmo pelas indústrias, vêm surgindo para diminuir os impactos desastrosos que o descarte dos resíduos agroindustriais causa à natureza, principalmente por possuir uma grande carga orgânica, uma vez que o descarte inadequado acaba por representar perda de biomassa, nutriente de alto valor e energia, provocando elevados custos ao governo e às indústrias para controlar os danos decorrentes da poluição (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000).

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, pois produzem uma série de resíduos de alto valor de (re)utilização (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROM, 2003).

2.1.1 Manipueira

Resíduo líquido resultante da prensagem da mandioca na fabricação da farinha ou quando se tem a obtenção da fécula (DEL BIANCHI, 1998). A manipueira é rica no glicosídeo linamarina, ácido cianídrico e nutrientes minerais, bem como outras substâncias orgânicas (carboidratos, proteínas e lipídeos) (NITSCHKE; PASTORE, 2006; FIORETTO, 2002). Dentre as formas alternativas de conversão dessa biomassa, a fermentação (anaeróbia e

aeróbia) é uma das principais formas de se utilizar a matéria orgânica renovável, como resíduos agroindustriais ricos em carboidratos, para se produzir biocombustíveis tais como o metano e o hidrogênio (YASMIN et al., 2000). A produção de energia secundária a partir da biodigestão anaeróbia de resíduos agroindustriais teve um avanço significativo com o surgimento da primeira crise do petróleo e a pressão dos sanitaristas por produções mais limpas e tratamentos mais adequados de efluentes. O processo leva à redução da DBO, produção de biofertilizante, pequena produção de lodo, baixos custos operacionais e de investimento, bem como a possibilidade de sistemas descentralizados de tratamento (CHERNICHARO, 1997). Rossman (2008) cita outra tecnologia que vem sendo estudada, a produção de biossurfactante a partir do *Bacillus subtillis* (NITSCHKE et al., 2004), sendo sua produção em escala piloto testada por Barros et al. (2007).

Uma das principais características deste resíduo agroindustrial é a carga orgânica elevada. Levando-se em conta que, no Brasil, o processamento da farinha de mandioca gera até 419 litros de manipueira e, ao ano, a produção chega até 26,6 milhões de toneladas de mandioca produzidas (FAOSTAT-FAO, 2008), 80% desse total é resíduo agroindustrial cujo descarte é realizado diretamente na rede de esgoto, provocando um crescimento desordenado de bactérias, interferindo na produção de oxigênio, sendo extremamente danoso à vida aquática, além de toda a toxicidade gerada pela presença de glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto, como a linamarina e a lotaustralina (CEREDA, 1994; GOODLEY, 2004).

Biotecnologicamente, a manipueira já foi estudada e comprovou-se a sua aplicação como substrato viável para o crescimento da linhagem CCT 0917 de *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico (LEONEL; CEREDA, 1995) e no crescimento das espécies *Penicilium* sp. 2025, *Aspergillus* sp. 2038 e *Fusarium oxysporum* 152B (MARÓSTICA; PASTORE, 2007).

2.1.2 Vinhaça

A vinhaça, também chamada de vinhoto, restilo ou calda da destilaria (ROSSETTO, 1987), é um resíduo líquido da indústria sucro-energética constituído de 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e minerais como potássio, cálcio e magnésio (FERRAZ et al., 1986) proveniente da destilação do álcool.

Assim como todos os outros resíduos agroindustriais, a problemática ambiental gerada é devido ao descarte inadequado por conta do alto volume gerado e alta demanda biológica de oxigênio (DBO) variando de 20.000 a 35.000 mg/L de vinhaça, uma carga poluidora muito grande (ROSSETO, 1987). De acordo com a Agrianual (2004), 170 bilhões desse resíduo são gerados anualmente, correspondendo a uma quantidade de esgoto doméstico produzido por uma população estimada de 232 milhões de pessoas durante o ano (LUKSSEMBERG; DURSO, 1980 apud GONÇALVES; SILVA, 2000). E, como a capacidade do solo é limitada para receber esse resíduo, alternativas para o tratamento ou re(utilização) da vinhaça são de grande importância.

A vinhaça possui um alto poder fertilizante. A principal razão para a grande capacidade de fertilização do produto obtido após fermentação se encontra no fato da digestão da biomassa diminuir drasticamente o teor de carbono presente na mesma, perdendo exclusivamente carbono sob a forma de CH₄ (SGANZERLA, 1983 apud GASPAR, 2003).

A produção do biogás por este resíduo ocorre pela conversão anaeróbia, em um biodigestor, uma câmara fechada onde se abriga biomassa, que pode ser qualquer efluente rico em matéria orgânica, e o inóculo, contendo as bactérias anaeróbicas metanogênicas, como esterco (CHERNICHARO, 1997).

É um processo que propicia a diminuição da carga de DBO da vinhaça, sendo largamente empregado e estudado para o tratamento de efluentes urbanos domésticos, além de efluentes de origem animal. Apresenta como vantagens o baixo consumo de energia, a pequena produção de lodo (descarte), a grande eficiência na diminuição da carga orgânica, baixo potencial poluidor, sendo que o biogás produzido poderá ser empregado no processo de produção de energia (FREIRE; CORTEZ, 2000).

A biomassa fornece substrato e o biodigestor fornece a condição anaeróbia para a proliferação dessas bactérias, que possuem como resultado de seu metabolismo biogás e, do que sobrou do substrato, o biofertilizante, mais rico em nutrientes NPK, essenciais aos vegetais, que o próprio efluente.

Para Mariano (2006), apesar de se ter uma legislação específica que determine a dosagem da vinhaça nos solos para que se aumente o rendimento da produção da cana-deaçúcar, a salinidade do solo é aumentada (CORAZZA, 1999), afetando a produção das

indústrias sucro-energética e os lençóis d'água subterrâneos.

Por conta de toda a riqueza de nutrientes que a vinhaça possui, ela se constitui uma alternativa válida na substituição da água nos meios de cultura para micro-organismos em processos de obtenção dos biossurfactantes (ACCORSINI, 2010).

2.1.3 Óleo residual de fritura

Os óleos vegetais residuais de fritura são de uso diário, inevitável para o uso alimentício e destinado, principalmente, à fabricação de sabões ou rações animais. O problema é que seu descarte ocorre de modo inadequado na rede de esgotos, o que é danoso ao meio ambiente pela solubilidade em água desses óleos vegetais ser baixa, prejudicando o tratamento da água utilizada para o abastecimento público (MITTELBACH; TRITHART, 1988).

Dentre os óleos de fritura estão os de canola, azeite de oliva, girassol etc. Contudo, o de soja é o de menor custo e, consequentemente, o de maior consumo no mercado brasileiro, tornando-se uma alternativa de fonte de carbono de baixo custo e de grande disponibilidade para a produção de biossurfactantes (CARA, 2009) e biodiesel.

O biodiesel vem sendo foco de vários estudos por ser um biocombustível que implica em menor fonte de poluição atmosférica e em um menor custo na sua produção, principalmente, quando se utilizam resíduos, sendo o óleo de fritura uma alternativa muito viável, necessária e vantajosa no setor empresarial, quer seja por razões econômicas quer seja por ambientais (CHRISTOFF, 2006). Os óleos vegetais ocupam uma posição proeminente no desenvolvimento de combustíveis alternativos embora atualmente ainda haja problemas associados ao seu uso direto em motores do ciclo Diesel (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006). A utilização de tais óleos no decorrer do tempo tem uma forte tendência de ser tão importante quanto o petróleo.

Poucos estudos existem sobre a produção de biossurfactantes a partir de substratos de óleos residuais de frituras. Todavia, já foi constatada a produção de biossurfactantes a partir da *Pseudomonas aeruginosa* (HABA et al., 2000).

2.2 Biossurfactantes como alternativa de tratamento de resíduos agroindustriais

Os biossurfactantes são verdadeiros sabões biológicos biodegradáveis e estruturalmente vastos de subprodutos metabólicos secundários, obtidos a partir de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Possuem propriedades tensoativas sendo, por isso, também chamados de biotensoativos (REDDY; CHINTHAMREDDY, 2000).

O principal fator na produção dos biossurfactantes é o alto custo de produção (MULLIGAN, 2005) e em alta escala (HEALY; DEVINE; MURPHY, 1996). Isto se deve aos baixos rendimentos pelos substratos utilizados, altos investimentos econômicos, dependência de processos altamente estéreis, necessidade de controle dos processos envolvidos, como a formação de espumas, dificuldades no processo de recuperação e purificação dos biossurfactantes, estruturas químicas complexas e dificuldade na realização dos procedimentos das análises químicas.

Para que os custos sejam minimizados, a seleção adequada de micro-organismos, a adaptação dos mesmos e melhorias de engenharia genética para se obter altos rendimentos, o uso de processos adequados, adaptados e de engenharias para baixos custos, a utilização de substratos com baixo valor econômico e investimentos em processos para aumentar valores agregados aos subprodutos gerados, principalmente, nos setores agroindustriais, são alguns focos de interesse dos pesquisadores (KOSARIC; CAIRNS; GRAY,1984 apud MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

Assim, para que haja um potencial de aplicações dos biossurfactantes e para que a expansão das atividades relacionados com seu uso se tornem economicamente viáveis, os processos em níveis biotecnológicos precisam ser otimizados, com o uso de matérias-primas de baixo custo, uma vez que estas representam entre 10% a 30% do custo total (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

Com o uso dos resíduos agroindustriais como fonte para o isolamento dos microorganismos e/ou fonte de carbono nos meios de cultura, nitidamente percebe-se a redução de custos nos processos de produção dos biossurfactantes. Na década de 80, os custos com a produção de biossurfactantes chegavam a US\$ 10/mg por cada miligrama produzida. A surfactina, com 98% de pureza, para uso medicinal, era produzida por cerca de US\$ 2 a 4 por cada quilograma para formulações de emulsão. Já na década de 90, houve redução nesses custos, permitidos com os avanços biotecnológicos capazes de dobrar a produção dos biossurfactantes e com preços mais baixos, variando de US\$ 3 a US\$ 20 por cada quilograma (BONGOLO, 1999).

Dentre as pesquisas biotecnológicas atuais, que ao mesmo tempo minimizam os danos causados à natureza e reduzem os custos da produção dos biossurfactantes, estão o soro do leite, a manipueira e resíduos de destilarias (BABU et al., 1996; PATEL; DESAI, 1997; DANIEL et al., 1998; COPPEDE et al., 2005; LIMA; DONALD; CARDOSO, 2005, NITSCHKE; PASTORE, 2006; KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1984; MERCADÉ et al., 1996; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998). Entretanto, ainda há poucos estudos com óleos residuais de fritura (HABA et al., 2000; JACKISCH-MATSURA; DURRANT, 2005), óleos lubrificantes (MERCADÉ et al., 1996) e borra oleosa de refinarias de petróleo (PIRRÔLLO, 2006).

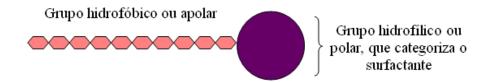
Para Rossmann (2008), vários desses substratos têm sido avaliados quanto a sua potencialidade em sustentar a produção de biossurfactantes.

2.3 Surfactantes

Surfactantes ou agentes de superfície (surface active agents) são moléculas com propriedades tensoativas que possuem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. São poderosas moléculas anfipáticas ou anfifílicas, que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas. Possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água por serem ativas de superfície, determinando propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, lubrificação, ação espumante ou antiespumante, capacidade molhante, solubilização e detergência. Essas moléculas podem ser produzidas por síntese química (surfactantes sintéticos) ou biológica (biossurfactantes) (WOODS; CHARLES, 2004).

Os surfactantes são categorizados em catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwiteriônicos, de acordo com a carga exibida pelo grupo hidrofílico da molécula, uma vez que o grupo hidrofóbico pouco varia (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002). Na Figura 1 encontra-se a representação esquemática de uma molécula de surfactante.

Figura 1-Representação esquemática dos grupos hidrofílico e hidrofóbico do surfactante.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

O grupo hidrofóbico ou parte apolar do surfactante é usualmente dominado por um hidrocarboneto (SABATINI et al., 2006), possuindo a cadeia hidrocarbônica de 10 a 20 átomos de carbono, que para Chu (2003) podem ser aromáticos ou alifáticos, em linha reta ou ramificada e carbonos reduzidos. Embora não seja o grupo que caracteriza o surfactante, o grupo hidrofóbico influencia na concentração micelar crítica (CMC), uma propriedade das moléculas tensoativas, diminuindo-a (MINATTI, 2005).

O grupo hidrofílico categoriza o surfactante, podendo ser iônico (catiônico ou aniônico), não-iônico ou anfotérico (BANAT, 1995). Os catiônicos são constituídos por sais de amônio, enquanto os aniônicos possuem a parte hidrofílica constituída por grupo carboxilato, hidroxi, sulfato ou fosfato. Surfactantes não-iônicos não contêm grupos com carga e, nos denominados anfotéricos, a parte hidrofílica é constituída por grupos que contêm uma carga negativa e uma positiva, o que lhes confere propriedades zwiteriônicas, dependendo do pH (WOODS; CHARLES, 2004).

Há a adição de uma quarta classe dos surfactantes, os quais têm na cabeça do agente tensoativo grupamentos poliméricos (PORTER, 1994).

No Quadro 1, alguns surfactantes são apresentados de acordo com suas composições químicas e com o grupo polar que determina a principal diferença ente os tipos de surfactantes.

Quadro 1-Estruturas de alguns surfactantes de acordo com a classificação de suas cargas predominantes no grupo hidrofílico.

| Tipo de surfactante | Fórmula do tensoativo | Nome | | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--|--|
| iônico-aniônico | $C_{12}H_{25}$ -OSO $_3$ -N a ⁺ | Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) | | |
| iônico-catiônico | $CH_{3}(CH_{2})_{11}N^{+}(CH_{3})_{3}Br$ | Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) | | |
| não-iônico | $C_{12}H_{25}-N^{+}(CH_{3})_{3}Cl^{-}$ | Cloreto de dodeciltrimetilamônio | | |
| nao-ionico | $CH_3(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_{23}OH$ | Polioxietileno(32)dodecanol (Brij 35) | | |
| anfotérico ou | $C_{12}H_{25}$ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ OH | Dodeciléter de pentaoxietileno | | |
| zwiteriônico | $CH_3(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_2(CH2)_5COO^-$ | 4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB) | | |
| cabeça polar | $-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_3$ | Fosfatidilcolina (lectina) | | |

Fonte: MANIASSO, 2001.

Os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos dos surfactantes agem sobre a superfície a ser adsorvida, interagindo com a parte apolar e polar, respectivamente, da substância a ser surfactada. Essas substâncias tensoativas em baixas concentrações têm a capacidade de serem adsorvidas na interface de dispersões líquidas, reduzindo a tensão interfacial. Tal adsorção na é consequência da estrutura molecular dos surfactantes, ou seja, a parte polar ou iônica interage fortemente com a fase aquosa por meio de forças do tipo dipolo-dipolo, enquanto a parte alifática apolar interage com a fase orgânica.

A dupla solubilidade faz com que a região de maior estabilidade para a molécula tensoativa seja na interface entre os dois líquidos. Assim, as moléculas tendem a se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre os grupos hidrofóbicos e a água, permitindo que os grupos polares fiquem na solução aquosa, próximos à superfície, e os grupos apolares na interface água-óleo reduzam o contato com a água. Isto gera uma diminuição na tensão superficial da água, pois provoca um desarranjo de sua superfície (WOODS; CHARLES, 2004).

A redução das tensões superficial e interfacial possibilita uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases, além de em meio aquoso formarem agregados denominados de micelas, as quais são responsáveis pela CMC que é a uma propriedade intrínseca e característica do surfactante, sendo a concentração mínima na qual se inicia o processo de formação de micelas (WOODS; CHARLES, 2004).

As aplicações dos surfactantes estão diretamente relacionadas às propriedades físicoquímicas de cada composto (KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1987). Algumas dessas propriedades são abordadas, explicando o porquê de essas poderosas moléculas tensoativas terem uma gama de aplicações industriais, quer seja no setor petrolífero, quer seja nos setores farmacêuticos, de higiene e cosméticos, mineração, agricultura, papel, têxtil e cerâmica.

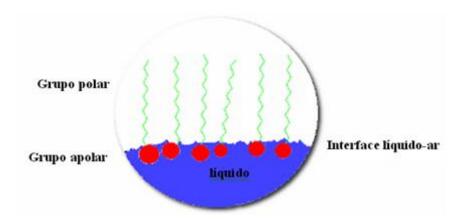
2.3.1 Tensão superficial

Os líquidos tendem a assumir a forma em que a área de sua superfície seja a maior possível para manter as moléculas com um elevado número de vizinhos semelhantes. As forças coesivas entre as moléculas no interior de um líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. Aquelas da superfície não têm átomos vizinhos acima delas e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado tensão superficial (MINATTI, 2005), simplificada por Sobrinho (2007) como sendo a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos.

A tensão superficial tem sua efetividade dimensionada através da energia livre por unidade de área requerida para trazer a molécula do seio da fase líquida para a superfície (ROSEN, 2004 apud MULLIGAN, 2005). Quanto menos trabalho é requerido para trazer a molécula para a superfície, mais a tensão superficial é reduzida.

A molécula de um surfactante, ilustrada na Figura 2, possui uma parte lipofílica, a cauda, e uma parte hidrofílica, a cabeça, que lhe confere a propriedade de interagir com as fases aquosa e orgânica e uma mistura. Essa dupla solubilidade faz com que a região de maior estabilidade para essa molécula seja a interface entre os dois líquidos. Quando um surfactante é adicionado à água, suas moléculas tendem a se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre os grupos hidrofóbicos e a água. Os grupos polares ficam na solução aquosa, próximo à superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-ar, minimizando o contato com a água. Esse fato gera uma diminuição na tensão superficial da água ao provocar um desarranjo em sua superfície, o mesmo ocorrendo para surfactantes solúveis em óleo (FILIPE, 1996).

Figura 2-Representação esquemática de como os surfactantes atuam para a redução interfacial dos líquidos.



Fonte: Adaptada de MINATTI, 2005.

A tensão interfacial da água/ar é de 72 mN/m a 25°C, e a adição de um surfactante pode reduzi-la para valores abaixo de 35 mN/m (MULLIGAN, 2005). Na água destilada, é reduzida de 72 mN/m para valores abaixo de 30 mN/m (DESAI; BANAT, 1997). Essas medições são facilmente realizadas com o auxílio de um tensiômetro.

Quando um surfactante é adicionado a sistemas água/ar ou óleo/água em concentrações crescentes, observa-se uma redução na tensão interfacial até um valor crítico, a partir do qual as moléculas de surfactantes se associam e formam estruturas supramoleculares, como micelas, bicamadas e vesículas (PIRÔLLO, 2006).

Na Figura 2, pode-se observar que, quando um surfactante é adicionado a um líquido, as suas moléculas tentam se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre os grupos apolares e o líquido. Os grupos polares do surfactante ficam na solução aquosa, próxima à superfície, e os grupos apolares ficam na interface líquido-ar, minimizando o contato com o líquido gerando uma diminuição na tensão superfícial do líquido por desarranjar a sua superfície.

2.3.2 Concentração micelar crítica (CMC)

A CMC está intrisecamente relacionada com a concentração do surfactante no meio aquoso, que é avaliada pela diluição micelar crítica (CMD), determinada pelo ponto de inflexão na curva de abaixamento da tensão superficial em função da diluição da solução (MÓRAM et al., 2000; MANIASSO, 2001), servindo para medir a concentração de

surfactantes. Quanto menor os valores de CMD, maior a diluição necessária para causar mudança significativa na tensão superficial e, portanto, maior a concentração de surfactante no meio.

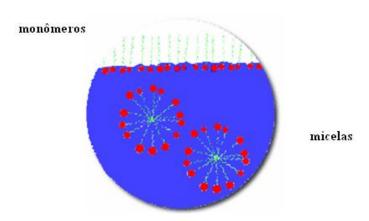
Em experimentos realizados por Nitschke, Ferraz e Pastore (2004) ao se utilizar bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais, as análises de CMD, para valores de CMD⁻¹ (quando diluído 10 vezes – sobrenadante diluído 1:10 em água destilada) e CMD⁻² (quando diluído 100 vezes – sobrenadante diluído 1:100 em água destilada), verificou-se um pequeno aumento nos valores da tensão superficial ao utilizar meio contendo manipueira. Entretanto, os valores da tensão superficial aumentaram significativamente para o maio contendo melaço.

A CMC também é dependente da redução da tensão superficial, que é definida como a concentração mínima de surfactantes utilizados para que se inicie o processo de micelização ou formação de micelas, como observado na Figura 3. As micelas são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna, decorrentes da adição de surfactante a um líquido para a redução da tensão interfacial. Uma das características comum a todos os surfactantes é a capacidade de formar pequenos agregados em solução aquosa ou oleosa a partir de uma determinada concentração (SAICHEK; REDDY, 2005).

A CMC é uma propriedade do surfactante que o avalia quanto a sua atividade, ou seja, traduz a solubilidade da substância tensoativa dentro da fase aquosa (RUFINO; SARUBBO; CAMPOS-TAKAI, 2007). A Figura 2.3 mostra a representação de quando se tem o início da formação de micelas, as quais ficam dispersas por toda a solução, não apresentando efeito sofre a redução da tensão superficial.

No entanto, as vesículas, em geral, são bem menos dinâmicas que as micelas e formam agregados mais estáveis. A dinâmica de interação de solutos com as vesículas é controlada pela estabilidade cinética vesicular. Essa interação, responsável pela manutenção de solutos no interior de vesículas, é bem maior do que nas micelas (ZANA, 2005).

Figura 3-Representação esquemática do comportamento de um surfactante em solução. aquosa após a CMC.



Fonte: Adaptada de MINATTI, 2005.

Numa micela, em meio polar como a água, a parte lipofílica da molécula se orienta para o interior e a hidrofílica para o exterior da micela, adquirindo formato duplo na formação das suas camadas sendo denominadas de admicelas, vesículas, ou lipossomos quando formados por fosfolípideos (ZANA, 2005).

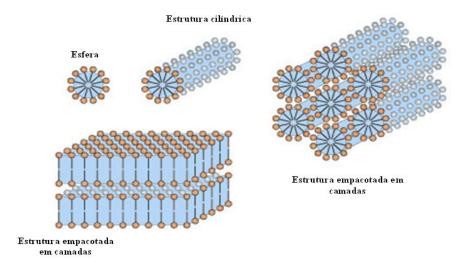
As micelas mais simples são esferas, mas à medida que a concentração do surfactante aumenta, elas crescem formando estrutura cilíndrica (SAICHEK; REDDY, 2005), como mostra a Figura 4. Um aumento adicional da concentração leva as estruturas cilíndricas a se empacotarem em estruturas geralmente hexagonais ou em camadas e, à medida que essas estruturas crescem, por aumento de concentração, mais ordenadas elas se tornam e as maiores podem adquirir propriedades de cristais líquidos (ROSEN, 2004).

O tipo de associação coloidal formada por um surfactante depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia hidrocarbônica) e das condições experimentais, como força iônica, pH, contra-íons, temperatura, etc. (MANIASSO, 2001).

As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, porém não são destruídas pela diluição com água quando a concentração do tensoativo se encontrar abaixo da CMC (MANIASSO, 2001). Ao contrário dos monômeros, as micelas ficam dispersas em toda a solução e não apresentam efeito sobre a tensão superficial da água. Contudo, quando a concentração dos monômeros é máxima, define-se, também, CMC (MULLIGAN, 2005). Quanto mais rápida as primeiras micelas se formarem em concentrações baixas de surfactante, muito mais econômico e eficiente será o processo

quando comparado à formação da primeira micela em altas concentrações.

Figura 4-Tipos de estruturas de surfactantes em solução.



Fonte: LIMA, 2007.

Esse comportamento da interface água/ar em função da concentração de surfactante utilizado é ilustrado na Figura 5, onde o ponto de inflexão indica o instante em que as micelas são formadas e, a partir desse ponto, não se consta mais qualquer redução da tensão superficial.

De acordo com Barros et al. (2007), a eficiência e a efetividade de um surfactante são características singulares e básicas que determinam o quão bom é o surfactante, sendo a eficiência medida pela concentração micelar crítica e a efetividade pelas tensões superficiais e interfaciais. Quantitativamente, a avaliação do surfactante é dada pela diluição micelar crítica, uma vez que quando se atinge o valor da tensão superficial, não mais ocorre a redução, mesmo que o processo continue e mais surfactante seja adicionado (BEHRING LUCAS; BARCELLOS, 2004).

Propriedades Físicas

Ponto de inflexão

Tensão superficial
Tensão interfacial

Concentração do surfactante

Figura 5-Diagrama esquemático da variação da tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante (CMC representa a concentração micelar crítica).

Fonte: Adaptada de MULLIGAN, 2005.

2.4 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos, principalmente, pelo crescimento aeróbio de micro-organismos e, quando excretados no meio de cultivo, durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999).

Em alguns casos, o micro-organismo mantém o biossurfactante produzido associado à parede celular, facilitando a penetração dos compostos de carbono na área periplasmática da célula (KOCH et al., 1991). Os biossurfactantes conhecidos são produzidos em substratos solúveis e insolúveis em água, como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, cultivados em diferentes fontes de carbono (BANAT, 1995).

Diferentemente dos surfactantes que têm sua classificação baseada no grupamento polar, os biossurfactantes são classificados estruturalmente de acordo com sua natureza bioquímica ou com a espécie microbiana produtora, embora o potencial de produção seja determinado pela genética dos micro-organismos e as condições ambientais e natureza do substrato também influenciem (BOGNOLO, 1999; RAHMAM et al., 2002).

Os glicolipídeos, cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos, são os mais conhecidos e formados por carboidratos (glicose, manose,

galactose ou ramnose) e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa (ex: ramnolipídeos, soforolípideos e trealolipídeos).

Os ramnolipídeos, ilustrados na Figura 6, são um dos grupos de surfactantes mais estudados e produzidos por várias de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de diversos substratos, inclusive os de baixo custo, incluindo alcanos, succinato, piruvato, citrato, frutose, glicerol, óleo de oliva, glicose e manitol (HOLMBERG, 2001) e em altas concentrações (LINHARDT et al., 1989; TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003).

HO O O CH CH₂ CH₂ COOH

(CH₂)₆
(CH₃)
(CH₃)
(CH₃)
(CH₃)
(CH₃)

— СН —— (СН ₂)₆ —— СН ₃

Figura 6-Estrutura do ramnolipídeo de *Pseudomona aeruginosa*.

Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

Os soforolipídeos, cuja estrutura é apresentada na Figura 7, são produzidos por leveduras, como *Candida bombicola, Candida magnoliae, Candida petrophilum, Candida bogoriensis* e *Candida apicola* (GORIN; SPENCER; TULLOCH; HILL; SPENCER., 1961; TULLOCH et al., 1968; COOPER; PADDOCK, 1984; GOBBERT et al., 1984; HOMMEL et al., 1987; HOMME; HUSE, 1993). Utilizam carboidratos (KLEKNER; KOSARIC; ZHOU, 1991), óleos vegetais (ZHOU et al., 1992), ácido oléico (RAU et al., 1996) e alcanos (DAVILA et al., 1994). Dependendo das condições de cultivo e da fonte de carbono, até doze diferentes soforolipídeos podem ser produzidos (ASMER et al., 1988). Soforolipídeos têm suas propriedades tensoativas mantidas em condições extremas de pH, NaCl e temperatura (COOPER; PADDOCK, 1984). Além das propriedades tensoativas, apresentam um grande potencial como agentes terapêuticos e podem funcionar como antibacterianos (SHAH; JURJEVIC; BADIA, 2007), anticancerígenos (SCHOLZ et al., 1998; CHEN et al., 2006), antivirais (SHAH et al., 2005), e antifúngicos (SHAH; JURJEVIC; BADIA, 2007).

Figura 7-Estrutura molecular de soforolipídeo de *Candida* (Torulopsis) *bombicola*.

Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

Os trealolipídeos, representado na Figura 8, são produzidos por espécies de *Mycobacterium, Nocardia* e de *Corynebacterium* (GAUTAM; TAYAGI, 2006). Trealolipídeos de diferentes organismos diferem no tamanho e estrutura do ácido micólico, no número de átomos de carbono e no grau de insaturação (ASSELINEAU; ASSELINEAU, 1978). Trealolipídeos de *Rhodococcus. erythropolis* (Figura 8) e *Arthrobacter* sp. reduzem a tensão interfacial do meio aquoso de 72 para valores abaixo de 40 mN m⁻¹ (KRETSCHMER BOCK; WAGNER, 1982).

Os fosfolipídeos são estruturas comuns a muitos micro-organismos, como o biossurfactante de *Corynebacterium lepus* e a fosfatidiletanolamina de *Acinetobacte*r sp. Os lipopetídeos ou lipoproteínas, como a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, é um dos biossurfactantes mais efetivos já relatados na literatura, onde dentre os representantes dessa classe se tem a gramicidina S, a polimixina, a iturina, a fengicina, a liquenisina, a bacilomicina e a micosubtilisina. Os lipossacarídeos possuem massa molar elevada e são solúveis em água, como o conhecido Emulsan, emulsificante extracelular produzido por hidrocarbonetos a partir da bactéria *Acinotobacter calcoaceticus*. Os ácidos graxos têm como destaque o ácido corinomicólico de *Corynebacterium* sp., os particulados como cianobactérias e patógenos e lipídeos neutros (alguns classificados como glicolipídeos) e proteínas hidrofóbicas (DESAI, DESAI, 1993).

Figura 8-Estrutura do trealolipídeo produzido por *Rhodococcus erythropolis*.

Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

Bactérias e leveduras produzem grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídeos surfactantes quando utiliza alcanos como fonte de carbono e de energia (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985). O HLB (Balanço Hidrofílico-Lipofílico) desses biossurfactantes é diretamente relacionado ao comprimento da cadeia hidrocarbônica de suas estruturas, representado por uma escala admensional com valores de 1 a 20, designando a natureza do agente tensotivo, desenvolvida por Griffin, em 1949. Valores altos de HLB tendem a formar emulsões óleo/água e valores baixos emulsões água/óleo (LACHMAN; LIERBERMAN; KANIG, 1986). *Acinetobacter* sp. produz vesículas de cadeias duplas com áreas de cabeça polar pequenas, denominadas fosfatidiletanolamina (KAPPELI e FINNERTY, 1979), apresentado na Figura 9, que são capazes de promover a formação de microemulsões de alcanos em água (DESAI e BANAT, 1997).

Fosfatidiletanolamina, produzida por *Rhodococcus erythropolis* durante o crescimento em meio de cultura contendo alcano como fonte de carbono e energia, leva a uma redução da tensão interfacial entre água e hexadecano para valores abaixo de 1 mN/m e apresenta uma CMC de 30 mg/L (KRETSCHMER; BOCK; WAGNER, 1982).

Figura 9-Estrutura de fosfatidiletanolamina de *Acinetobacter* sp.. R₁ e R₂ são cadeias de hidrocarbonetos.

Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

A maioria dos lipídeos neutros, como os triacilgliceróis e seus ácidos graxos constituintes, mostram algum grau de atividade tensoativa. Assim como os ácidos micólicos, eles consitituem ácidos graxos mais complexos. Estes compostos, por sua vez, são sintetizados por espécies de *Mycobacterium* spp. e por alguns espécies dos gêneros de *Nocardia, Corynebacterium* e *Rhodococcus*; possuem misturas de ácidos graxos α e β-hidroxilados ligados a longas cadeias hidrocarbônicas. A Figura 10 mostra um exemplo de ácido corinomicólico.

Figura 10-Ácido corinomicólico de Corynebacterium sp. R1 e R2 são grupamentos alquílicos.

Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

Biossurfactantes poliméricos ou lipopolissacarídeos são ácidos graxos ligados covalentemente a polissacarídeos. Destacam-se o Emulsan, o Liposan, a Manoproteína e outros complexos de proteínas-polissacarídeos. Emulsan, ilustrado na Figura 11, é um bioemulsificante extracelular produzido por *A. calcoaceticus* RAG-1 e foi o primeiro surfactante microbiano a ser produzido e comercializado em larga escala, sendo um dos emulsificantes mais efetivos (ROSENBERG; RON, 2001). É caracterizado como um heteropolissacarídeo polianiônico (FERRAREZZO, 1998).

CH₃
(CH₂)₈
(CH₂)
(CH₂)₈
(CH₂)₈
(CH₂)₈
(CH₂)₈
(CH₂)₈
(CH₂)₈
(CH₂)
(CH₂)₈
(CH₂)₈
(CH₂)
(CH₂)₈
(CH₂)
(CH₂)₈
(CH₂)
(CH₂)₈
(CH₂)
(CH₂)₈
(CH₂)
(

Figura 11-Estrutura de Emulsan de Acinetobacter calcoaceticus.

Fonte: DESAI & BANAT, 1997.

Liposan é um emulsificante extracelular sintetizado por *C. lipolytica*, sendo composto de 83% de carboidrato e 17% de proteínas (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984).

Manoproteína é uma proteína produzida por *S. cerevisiae*, possuindo excelente atividade emulsificante com vários óleos, alcanos e solventes orgânicos (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988). É produzida através de um processo biotecnológico simples, de larga escala e baixo custo.

As células microbianas e vesículas extracelulares com atividades tensoativas são classificadas como biossurfactantes particulados. Algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biossurfactantes, a exemplo de algumas espécies de cianobactérias e patógenos, como *S. aureus* e *Serratia* sp. Bactérias do gênero *Acinetobacter* sp., quando crescem em meio contendo hexadecano, produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante (GAUTAM; TAYAGI, 2006).

Um grande número de micro-organismos tem se mostrado capaz de produzir compostos com atividade interfacial variada, cujas funções ainda não foram totalmente elucidadas. Os biossurfactantes podem ser classificados a partir de sua massa molar, que varia geralmente entre 500-1500 Daltons e os valores de CMC entre 1 e 200 mg/L (BODOUR et al., 2004). No Quadro 2 são apresentadas algumas destas estruturas (DESAI; BANAT, 1997).

Quadro 2-Classificação dos biossurfactantes de acordo com a massa molecular.

| Classificação | | Biossurfactante | Micro-organismo | Referência . |
|----------------------|---------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| | | Ramnolipídeos | Pseudomas aeruginosa | BENINCASA et al., 2004. |
| | Glicolipídeos | Trealolipídeos | A. paraffineus, Rhodococus enthropolis | UCHIDA et al., 1989 |
| | | Soforolipídeos | Candida lypolitica, T. bombicola, Candica lombicola, Candida apícola | HOMMEL et al., 1994 |
| | | Flavolipídeos | Rhodococus erythropolis, Flavobacterium sp MTN11 | UCHIDA et al., 1989 |
| Η. | Lipopetídeos e lipoproteínas | Surfactina | B. subtilis, B. pumilus | CAMILI et al., 2003 |
| Baixo peso molecular | | Gramicidina S | B. brevis | AZUMA & DEMAIN, 1996 |
| peso m | | Polimixina | B. polymyxa | FALAGAS et al., 2003 |
| Baixc | | Viscosina | P. fluorescens | NEU et al.,1990 |
| | | Peptídeo-lipídeo | B. lichenifomis | YAKIMOV et al., 1998 |
| _ | | Surfactina | B. subtilis, B. pumilus | CAMILI et al., 2003 |
| | Ácido graxo, lipídeos e fosfolipídeos | Ácidos graxos | Corynebacterium lepus | MAKKAR & CAMEOTRA, 2002 |
| | | Lipídeos neutros | Nocardia erythropolis | MAKKAR & CAMEOTRA, 2002 |
| | | Fosfolipídeos | Thiobacillus thicoxidans | LEMKE et al., 1995 |
| | S | Emulsan | Acinetobacter, Calcoaceticus | ROSEMBERG, 1993 |
| | Surfactantes poliméricos | Biodspersan | Acinetobacter calcoaceticus | ROSEMBERG, 1988 |
| cular | | Liposan | Candida lipolytica | CIRIGLIANO & CARMAN, 1984 |
| Alto peso molec | | Monoproteína | Saccharomyces cervisiae | CAMERON et al., 1988 |
| | | Alasan | Acinetobacter redioresistens | NAVON-VENEZIA et al., 1995 |
| | Surfactante particulado | Vesículas | Acinetobacter calcoaceticus | DESAI & BANAT, 1997 |

Fonte: ROSEMBERG; RON, 1999.

Algumas bactérias e leveduras excretam compostos iônicos que emulsificam hidrocarbonetos no meio de crescimento, tais como os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e os soforolipídios produzidos por espécies de *Torulopsis* e por *Candida bombicola* (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIECHTER, 1984; LANG, 2002).

Outros produtores de biossurfactantes eficazes são *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas rubescens*, *Gluconobacter cerinus* e *Thiobacillus ferrooxidans* (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999).

Ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são comercializados para uso em aplicações ambientais. A mais notável foi a testada no Alasca quando o navio petroleiro Exxon Valdez, ao afundar, ocasionou um derramamento de 33.000 toneladas de óleo cru, contaminando várias praias e superfícies marinhas (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001).

2.4.1 Propriedades específicas

Apesar da diversidade de composição química, algumas características físicoquímicas são comuns à maioria dos biossurfactantes. As suas propriedades físicas, como
redução da tensão superficial, capacidade espumante, emulsificante e estabilizante,
concentrações micelares críticas baixas, solubilidade e poder detergente são muito
importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de micro-organismos com
potencial de produção deste agente (DELEU e PAQUOT, 2004). Essas características
conferem vantagens sobre os surfactantes sintéticos ou convencionais (ABU-RUWAIDA et
al., 1991; STAMPFLI; NERSTEN, 1995) e determinam as possíveis aplicações dos
biossurfactantes.

As atividades interfacial e superficial dos biossurfactantes são mais eficientes e efetivas do que os surfactantes sintéticos por promoverem uma redução maior da tensão interfacial em menores concentrações de bioprodutos (COOPER, ZAJIC e GERSON, 1979). Um biossurfactante eficaz pode reduzir a tensão interfacial de soluções aquosas à faixa de 40 a 25 mN/m (COOPER; ZAJIC, 1980).

A surfactina, um biossurfactante lipopeptídico cíclico, produzida por várias linhagens de *Bacillus subtilis*, pode reduzir a tensão interfacial da solução aquosa para até 27 mN/m, sendo relatada como um dos biossurfactantes mais ativos (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; WEI; CHU, 1998). Ramnolipídios de *P. aeruginosa* reduzem a tensão interfacial para uma faixa de 30 a 25 mN/m, podendo atuar como emulsificantes de alcanos e estimular o crescimento de *P. aeruginosa* em hexadecano (DEZIEL et al., 1999).

A CMC dos biossurfactante, medida de sua eficiência, varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m, respectivamente (BANAT, 1995).

Os biossurfactantes possuem maior estabilidade e tolerância térmica, força iônica, salinidade e pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas. Alguns biotensativos suportam temperaturas de até 90°C e pHs entre 5 e 12 (ABU-RUWAIDA et al., 1991; STAMPFLI; NERSTEN, 1995).

Os biossurfactantes não precipitam ou perdem sua funcionalidade em concentrações de até 10% de sal, enquanto que 2-3% de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais (ROCHA et al., 1992; BOGNOLO, 1999). Também são facilmente biodegradados na água e no solo (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005), o que os tornam adequados para aplicações na biorremediação e no tratamento de resíduos.

A biodegradabilidade de surfactantes é um atributo que pode ter efeitos positivos e negativos no seu uso para biorremediação. Os efeitos negativos podem ser causados pelo esgotamento de minerais e oxigênio, pela toxicidade de seus intermediários ou pela degradação preferencial do surfactante, em detrimento da degradação do poluente-alvo (TIEHM, 1994). O efeito positivo mais óbvio da degradação do surfactante é a sua remoção do local onde foi aplicado.

Por apresentar baixa toxicidade, os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com efeitos alérgicos dos produtos artificiais, sendo permitido em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

Também possuem a capacidade de quebrar emulsões e as tornarem estáveis (WEST e HARWELL, 1992; NITSCHKE; PASTORE, 2002), mantendo a dispersão de um líquido em outro. As emulsões resultantes podem ser prontamente separadas com adição de enzimas, como a depolimerase, que age na quebra da emulsão hidrocarboneto-óleo. Essa propriedade é de fundamental importância nos processos de biorremediação, por garantir a emulsificação das moléculas hidrofóbicas no meio aquoso, tornando-as mais susceptíveis ao ataque microbiano e aos processos de evaporação ou oxidação (KARANTH; DEO; VEENANADIG,

1999). Além disso, a remoção do óleo contido nas borras oleosas fundamentalmente dependentes dessa propriedade (BANAT et al., 1991).

Outra característica importante é que podem ter sua produção a partir de substratos renováveis, como manipueira, melaço, óleo de semente (*soapstock*), óleo de girassol, entre outros (SULLIVAN, 1999).

Dentre as propriedades tensoativas vantajosas dos biossurfactantes, a alta compatibilidade com as membranas biológicas fica, portanto, intrinsecamente relacionada com esses surfactantes biológicos. Atribui-se a ela a sua estrutura polimérica e o seu conteúdo de grupos polifuncionais, que fazem com que essas substâncias apresentem, em regra, uma menor polaridade que os surfactantes sintéticos.

Como resultado dessa propriedade, os biossurfactantes apresentam uma maior compatibilidade com membranas biológicas quando comparados com muitos dos tensoativos sintéticos utilizados para tratamento de ambientes contaminados com compostos orgânicos hidrofóbicos (AL-TAHHAN; SANDRIN; BODOUR; MAIER, 2000; HUA et al., 2003). Nesses processos, a presença de biossurfactantes propicia uma interação entre os compostos orgânicos hidrofóbicos e a superfície celular dos micro-organismos. Este fato não surpreende, dado que muitos dos surfactantes sintetizados pelas bactérias, mesmo sob condições naturais, têm como função a de regular a adesão de células bacterianas às superfícies de substratos lipofílicos (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

Nos Quadros 3 e 4 são apresentadas as vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes frente à concentração micelar crítica, redução da tensão superficial e a concentração efetiva que causa a mortalidade de 50% dos micro-organimos teste, respectivamente.

Quadro 3-Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) de biossurfactantes e surfactantes.

| Natureza do surfactante | Surfactante | Tensão superficial (mN/m) | CMC (mg/L) | |
|----------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|---------------|--|
| | Rhodococus rubber – glicolipídeo | 26,8 | 54 | |
| | Rhodococus erythropolis – trealose treta éster | 26 | 15 | |
| Biológico | Pseudomonas aeruginosa – ramnolipídeo | 29 | 50-200 | |
| | Candica bombicola – soforolipídeo | 33 | 82 | |
| | Bacillus subtilis – surfactina | 27 | 23 | |
| Sintético | Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) | 37 | 2120 | |
| Simetico | Triton X-100 | 35 | 268 | |

Fonte MULLIGAN, 2005.

Quadro 4-Toxicidade de biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos.

| Natureza do surfactante | Surfactante | CE ₅₀ (mg/L) | |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|--|
| | Rhodococus rubber – glicolipídeo | 650 | |
| Biológico | Rhodococus erythropolis – trealose tretaéster | 49 | |
| | Pseudomonas aeruginosa – ramnolipídeo | 1000 | |
| Sintético | Finasol OSR-5 [®] | 7 | |
| Sintetico | Coretix 9597® | 5 | |

Fonte: IVSHINA et al., 1998.

Conforme dados da literatura, são exigidas menores quantidades de biossurfactantes para que os monômeros dessas moléculas se aglomerem formando as primeiras micelas, influenciando nas forças atrativas do líquido e na polaridade do mesmo, desarranjando sua superfície e reduzindo a tensão superficial.

A concentração efetiva que causa a mortalidade de 50% dos organismos-teste é pequena para o surfactante sintético, enquanto que os biossurfactantes precisam de concentrações bem maiores para inviabilizar 50% destes organismos. Com essa propriedade dos biossurfactantes, pode-se estabelecer o impacto ambiental que substâncias químicas causariam para a biota de um dado ambiente, servindo pra se administrar o tratamento ou liberação do uso das mesmas no meio ambiente.

Os micro-organismos são úteis nos testes de ecotoxicidade, pois podem ser avaliados

em um curto tempo e ocupam níveis tróficos onde a bioacumulação é problema potencial (VAN BEELEN; DOELMAN, 1997). Os testes de toxicidade bacteriana medem uma ampla variedade de "endpoints" e incluem testes de mutagenicidade (LAYTON et al., 1999), crescimento populacional (NENZDA; SEYDEL, 1988), produção de CO₂ (JARDIN et al., 1990), biossíntese enzimática, mineralização da glicose (RETEUNA; VASSEUR; CABRIDENC, 1989) e a inibição da bioluminescência (RIBO; KAISER, 1987 apud LAYTON et al., 1999). Entre os bancos de dados de toxicidade bacteriana, o mais amplo refere-se à inibição da bioluminescência em *Vibrio fischeri* ou ao ensaio MICROTOX (KAISER; DEVILLERS, 1994 apud LAYTON et al., 1999).

2.4.2 Caracterização e Quantificação

A detecção de micro-organismos produtores de biossurfactantes pode ser realizada por várias técnicas qualitativas, dentre elas a do colapso da gota, em que uma gota de uma suspensão celular é adicionada a uma superfície untada com óleo. O resultado é considerado positivo quando o diâmetro da gota for maior do que o de uma gota de água deionizada (controle negativo) (JAIN et al., 1991; BODOUR e MILLER-MAIER, 1998). Outro método comumente empregado é o do anel de du Nouy, que fornece a medida da tensão superficial e interfacial em um tensiômetro (PASSERI et al., 1992; BODOUR; MILLER-MAIER, 1998; KUYUKINA et al., 2001; MULLIGAN et al., 2001).

As caracterização e quantificação dos biossurfactantes podem ser feitas, também, por cromatografia de camada fina analítica (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo essa última uma alternativa efetiva para a análise de biossurfactantes em razão de sua maior sensibilidade e seletividade quando comparada às medidas de tensão e análise por TLC (LIN; CHEN; LIN, 1998). A análise por CLAE requer amostras de biossurfactantes relativamente puras, somente obtidas após operações trabalhosas de purificação. Os biossurfactantes extracelulares podem ser concentrados efetivamente por ultrafiltração com uso de membranas que retêm as micelas de biossurfactantes. A separação de vários tipos de biossurfactantes, produzidos por uma mesma espécie microbiana, é possível com o uso de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC/MS) (DÉZIEL et al., 1999). A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) pode ser usada para a quantificação dos biossurfactantes, pois a maioria possui um radical carbonila, ligação éster ou ácido carboxílico, os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético (GARTSHORE e COOPER, 2000). É usada também a espectrometria de

ressonância magnética nuclear (RMN) para a elucidação estrutural dos biossurfactantes (GARTSHORE; COOPER, 2000).

2.4.3 Produção

Os biossurfactantes são sintetizados por duas vias metabólicas, a dos hidrocarbonetos e a dos carboidratos, que estão envolvidos na síntese de seus grupos hidrofóbico e hidrofílico (DESAI et al., 1997). As vias para a síntese dos dois grupos precursores são diversas, porém a síntese de ambas as partes depende do substrato.

Vários estudos indicam que o tipo de meio e as condições de crescimento podem influenciar no rendimento do biossurfactante (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998, LANG, 2002). A quantidade e a qualidade dos biossurfactantes são influenciadas tanto pela fonte de carbono, que influencia diretamente a síntese por indução ou repressão (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998), quanto por limitações como as concentrações de fósforo, oxigênio, manganês e ferro no meio ou de outros elementos traços, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995). Também pode ser influenciada pelas técnicas de recuperação dos biossurfactantes, como centrifugação, ultrafiltração, precipitação, extração com solventes e adsorção por cromatografia (FIEBIG et al., 1997; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; KUYUKINA et al., 2001). Em alguns casos, é influenciada pela adição de substratos imiscíveis que induzem a produção de biossurfactantes, a exemplo da síntese do soforolipídio por *Torulopsis magnoliae*, induzida pela adição de ácidos graxos, hidrocarbonetos ou glicerídios ao meio de cultura (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). A síntese de trealolipídio por *R. erythropolis* é induzida pela adição de hidrocarbonetos, e a dos glicolipídios de *P. aeruginosa* pela adição de alcanos (LANG, 2002).

A repressão da produção de biossurfactantes por várias espécies de bactéria foi observada na presença de ácidos orgânicos, glicose, acetato e ácido tricarboxílico em muitas espécies de bactéria (LANG, 2002). O nitrogênio pode ser a peça chave na regulação da síntese de biossurfactantes (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

A produção em batelada de biossurfactantes pode ser feita por micro-organismos originados de um inóculo de lodo ativado, crescidos em melaço, um substrato de baixo custo, como fonte de carbono (GHURYE; VIPULANANDAN, 1994). Esse processo pode ser adaptado para a produção de biossurfactante destinado a tratamento de solo e de ambientes

aquáticos contaminados. A atividade desses, contudo, é afetada pelo pH e pela concentração de sais no meio de cultura.

A maioria das moléculas de biossurfactantes sintetizadas é liberada no meio de cultura na fase exponencial de crescimento dos micro-organismos. Em certos casos, as moléculas podem ser mantidas no interior das células ou permanecer aderidas às membranas (DESAI e BANAT, 1997). Dependendo da espécie microbiana e das condições de cultivo, o biossurfactante é produzido durante uma parte do ciclo de crescimento e, a seguir, é desativado ou incorporado em outro metabólito, como ocorre quando *B. licheniformes* é cultivado em meio mineral. O máximo acúmulo do agente ativo no meio de crescimento ocorre na metade da fase exponencial e, subseqüentemente, decresce rapidamente, provavelmente por ser convertido em um metabólito sem atividade surfactante (GEORGIOU; LIN; SHARMA, 1992).

Várias patentes já foram requeridas para processos de produção de biossurfactantes. Em 2001, no Japão, a empresa Showa Denko K. K. (SDK) melhorou a produção e venda de um biossurfactante inovador para aplicações cosméticas, denominado de "Aminofect", um análogo da surfactina. A avaliação de resultados confirmou que é altamente ativo como agente de superfície, mostrando alta estabilidade de emulsificação e dispersão, mesmo em baixas concentrações. Também foi confirmado que o "Aminofect" provê um grau de irritação de pele substancialmente mais baixo que o grau de "irritação convencional", sendo altamente biodegradável e seguro (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

2.4.4 Aplicação

A aplicação dos biossurfactantes está diretamente relacionada às propriedades físicoquímicas de cada composto (KOSARIC, CAIRNS e GRAY, 1984). O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (BANAT, 1995). Outras aplicações incluem os processos de biorremediação e a dispersão no derramamento de óleos, a remoção e mobilização de resíduos de óleo de tanques de armazenamento e a recuperação melhorada de petróleo.

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem produtos de higiene e cosméticos, mineração, agricultura, a indústria de papel, têxtil e cerâmica. O Biodispersan tem

aplicação na indústria de tintas (ROSENBERG; RON, 1999), pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura. As propriedades de estabilização de espuma são necessárias na fabricação de extintores de incêndio (REISER et al., 1989).

2.4.4.1 Biorremediação

A contaminação ambiental por petróleo e seus derivados causam grande impacto ambiental e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas, pois essas substâncias apresentam propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos (TONINI; REZENDE e GRATIVO, 2010).

Vários estudos com biossurfactantes vêm sendo largamente utilizados nos processos de remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos policílcicos aromáticos (HPAs). A presença do biossurfactante nesse ambiente detém a função de degradar compostos hidrofóbicos, uma vez que aumentam a área superficial das gotas de óleo, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando, por sua vez, a produção de biomassa microbiana (MULLIGAN; YONG e GIBBS, 2001; RON; ROSENBERG, 2001; YAKUBU, 2007; CAMEOTRA; SINGH, 2009).

A eficiência de cada processo de degradação (biorremediação de HPAs, bioaumentação, bioestimulação, biorremediação intríseca, *landfarming*, *bioventing*, compostagem, biorreatores, biofilmes e *pump and treat*) depende de fatores físicos, químicos e biológicos, como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração. Além disto, diversos fatores ambientais, que abrangem pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia, disponibilidade de receptores de elétrons, bem como a presença de co-metabólitos influenciam a utilização de poluentes pelos micro-organismos (BOOPATHY, 2000; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003; JACQUES et al., 2007; SEO; KEYN; LI, 2009).

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza micro-organismos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente (AUTRY; ELLIS, 1992).

Grande parte das reservas de petróleo encontra-se no mar e os processos de transporte, estocagem e refino são os responsáveis pela introdução de quantidades consideráveis desse composto no ambiente. Os derramamentos acidentais de petróleo geralmente causam grandes

impactos ambientais, o que exige a remoção imediata do contaminante. Diversas estratégias para remediação de áreas afetadas por petróleo são atualmente disponíveis. Entretanto, as estratégias convencionais apresentam problemas operacionais em razão do seu alto custo e da necessidade de pessoal e equipamentos especializados. Diante disso, os processos de biorremediação tornam-se uma estratégia alternativa às tecnologias convencionais para remediação de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados, com um menor custo operacional e mínimos efeitos adversos ao ambiente (HEAD, 1998; OLLIS, 1992).

O uso de surfactantes produzidos por micro-organismos vem se apresentando como uma ferramenta adicional para a remediação de áreas contaminadas com petróleo (CHA, 2000). Diversas espécies de bactérias liberam biossurfactantes na presença de hidrocarbonetos hidrofóbicos, promovendo o aumento da solubilidade desses compostos no meio (BICCA et al., 1999; BANAT, 1995). Parece plausível admitir que esses micro-organismos, em ambientes com limitação de substratos orgânicos, possam usar esse mecanismo como uma estratégia de sobrevivência.

Lindley e Heydeman (1986) citam que o fungo *Cladosporium resinae* cresceu em misturas de alcanos, produzindo ácidos graxos e fosfolipídios extracelulares, principalmente o ácido dodecanóico e a fosfatidilcolina (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999). O meio de crescimento suplementado com fosfatidilcolina aumentou a taxa de degradação do alcano em até 30%.

Após emulsificados no meio aquoso, os contaminantes presentes em solos podem ser recuperados ou subsequentemente degradados em biorreatorres, como demonstram os estudos sobre lavagem *in situ*, utilizando-se dois surfactantes sintéticos (ELLIS; PAYNE; MONABB, 1985), e os estudos de remoção de bifenis policlorados (PCBs) e de hidrocarbonetos do petróleo por biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* sp. (EHRLICH; SCHROEDER; MARTIN, 1985).

Os micro-organismos produtores de surfactantes também podem ser usados para aumentar a solubilização de outros grupos de compostos orgânicos tóxicos, como os defensivos agrícolas (EHRLICH; SCHROEDER; MARTIN, 1985). A degradação de hexaclorociclohexano por *P. aeruginosa* foi relatada, sendo que outros organoclorados como DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999). O surfactante de *P. aeruginosa* UG2

aumentou a solubilização de hexaclorobifenila aderida ao solo e resultou na recuperação de até 31% do composto na fase aquosa (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999). Recuperação três vezes superior à obtida com o surfactante químico, lignossulfonato de sódio.

O uso de biossurfactantes para a biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo também tem sido estudado (MULLIGAN YONG; GIBBS, 2001). Surfactina de *B. subtilis* e ramnolipídio de *P. aeruginosa* solubilizaram o cobre ligado organicamente ao sedimento, enquanto soforolipídio de *T. bombicola* foi capaz de solubilizar o zinco ligado aos componentes inorgânicos. Tais metais solubilizados podem ser removidos por processos de lavagem (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001).

2.4.4.2 Limpeza de reservatórios de óleos

Aproximadamente 1% do óleo total processado na Refinaria de Duque de Caxias (RJ) é descarregado como borra oleosa, normalmente após ter sido acumulado em tanques de armazenamento. A remoção das borras oleosas requer lavagens com solventes ou limpeza manual, ambas operações perigosas, demoradas e caras (SORIANO; PEREIRA, 1998). A incineração desse resíduo não é recomendável, dado o alto custo da energia envolvida, o alto risco de poluição do ar e a persistência dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Soriano & Pereira (1998) realizaram o tratamento de borra oleosa através da estimulação de micro-organismos nativos em um biorreator, atingindo biotratamento após 21 dias, o qual resultou em um percentual significativo de biodegradação pelos micro-organismos nativos (89% de óleo e graxas, 99% de parafinas e 83% de aromáticos).

Alternativamente, Banat et al. (1991) demonstraram que borra oleosa de tanques de armazenamento de petróleo pode ser limpa com meio de cultura contendo biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* em substituição aos surfactantes convencionais. Aproximadamente 91% (774 m³) de hidrocarbonetos presentes no resíduo foram recuperados e o óleo recuperado pode ser reaproveitado integralmente para refino, sendo o valor desse produto capaz de cobrir a operação de limpeza (US\$ 100.000–150.000 por tanque). Os sólidos resultantes continham um baixo teor de óleo residual, tornando o descarte desses resíduos ambientalmente seguros.

2.4.4.3 Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)

A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza micro-organismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os micro-organismos produzem polímeros e surfactantes que ajudam na recuperação do óleo, em razão da redução da tensão na interface óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (BANAT, 1995).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de micro-organismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subseqüente crescimento *in situ*. A injeção de nutrientes no reservatório estimula o crescimento de micro-organismos nativos produtores de surfactantes ou, ainda, a produção de biossurfactantes em reatores e posterior injeção no reservatório (BANAT, 1995). A última estratégia é mais cara, dada a necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997). As outras requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de biossurfactantes (BANAT, 1995). Para serem úteis para MEOR *in situ*, os micro-organismos devem apresentar capacidade de crescimento sob as condições extremas encontradas em reservatórios de óleos, tais como altas temperaturas, pressão, salinidade e baixos teores de oxigênio (GHURYE; VIPULANANDAN, 1994; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; BOGNOLO, 1998).

Estudos de simulação estimaram que mais de 27% dos reservatórios de óleos dos EUA se apresentaram capazes de sustentar o crescimento microbiano e a MEOR (CLARK et al., 1992 apud KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999). A eficácia da MEOR já foi relatada em estudos de campo nos EUA, na República Tcheca, na Romênia, na Rússia, na Hungria, na Polônia e na Holanda, sendo significativo o aumento na recuperação de óleo em alguns casos (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999).

Os biossurfactantes podem ser utilizados para reduzir a viscosidade de óleos pesados, facilitando a recuperação do óleo em jazidas e o transporte em oleodutos (BOGNOLO, 1998). Os emulsificantes com alto peso molecular, como o lipopolissacarídio produzido por *Acinetobacter calcaoceticus* RAG-1, podem ter inúmeras aplicações na indústria do petróleo, a exemplo da limpeza de óleo de barcaças e tanques, da redução da viscosidade de óleos pesados e aumento da recuperação de óleos de reservatórios naturais (CHA, 2000).

2.5 Isolamento e seleção de micro-organismos

Devido à grande quantidade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, presentes em um meio natural altamente competitivo, aliado a todas as vantagens fisiológicas e metabólicas possíveis para se ter um desenvolvimento melhor em relação aos outros micro-organismos competidores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006), estudos estão sendo cada vez mais realizados para que se obtenham colônias puras do organismo que fornece produtos de interesse.

Os micro-organismos são os principais agentes responsáveis pela reciclagem do carbono na natureza, degradando uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias, apresentando-se como poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento e resolução de problemas ambientais (SOUZA et al., 2005). As bactérias capazes de degradar estes hidrocarbonetos podem, às vezes, produzir biossurfactantes, os quais melhoram a solubilidade de poluentes hidrofóbicos e, assim, a sua biodegradabilidade (ATLAS, 1997).

A técnica microbiológica pela qual se obtém as culturas puras que fornece produtos de interesse é denominada de isolamento. Na fase do isolamento ocorre a seleção de uma colônia através da observação da produção de determinado produto ou da morfologia, tamanho, pigmentação, aspecto e consistência da colônia (STANBURY, WHITAKER; HALL, 1995). Apesar de existir a possibilidade de utilizar micro-organismos geneticamente modificados, ainda é possível encontrar uma grande variedade de novos micro-organismos no meio ambiente, sendo que muitos podem ser até comercialmente interessantes. O isolamento se inicia com a escolha da fonte mais provável de conter o micro-organismo desejado, podendo variar desde solo até águas, ar, lodo, alimentos ou órgãos. Características que um determinado organismo possui para se desenvolver em certo ambiente são usadas como fatores seletivos no processo de isolamento de uma colônia (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995). Normalmente, as colônias apresentam características morfológicas diferentes, as quais permitem a distinção entre micro-organismos. No entanto, para conseguir uma visualização das colônias independentes no meio sólido, é necessária a distribuição uniforme das bactérias, fungos ou leveduras sobre a placa de Petri (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006).

O isolamento, assim como todo o processo que irá se desenvolver futuramente, deve ser o mais econômico possível, levando-se em consideração a produtividade que será obtida pelo micro-organismo e os gastos necessários. Fatores importantes na escolha de um micro-organismo são as suas características nutricionais, pois se almeja obter aqueles que utilizem substratos baratos, que podem ser obtidos através de formulação adequada do meio de isolamento; a temperatura ótima, pois organismos com temperatura ótima acima de 40°C facilitam o isolamento, e reduzem os custos de resfriamento do fermentador, a compatibilidade com o fermentador utilizado e com o processo de cultivo desejado, e deve ser geneticamente estável ou, quando se deseja a manipulação genética, devem ser conhecidos os melhores mecanismos (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

Os micro-organismos isolados podem ser obtidos a partir de ambientes naturais ou a partir de bancos de cepas. Esses centros de cepas podem fornecer micro-organismos de características já conhecidas, mas nem sempre estão presentes os melhores caracteres desejados, enquanto o ambiente possui uma infinidade de variações. Os bancos de culturas têm como função o armazenamento, a prevenção de eventuais mudanças nas suas características, o ensino e a pesquisa sobre manutenção e caracterização de cepas (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988). Pode ser mais barato comprar uma cultura do que isolá-la da natureza, mas também pode ser que se encontre um organismo muito melhor depois de uma procura extensa no meio ambiente. Mas geralmente é necessário utilizar uma cepa dos bancos como uma referência para a comparação com novos micro-organismos descobertos através do isolamento da natureza (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

2.6 Análise por componentes principais (ACP)

ACP (Análise por Componentes Principais), também chamada de Transformada Discreta de *Karhumen-Loève* (KTL) ou ainda Transformada *Hotelling*, é uma técnica estatística utilizada para analisar inter-relações quando se há um grande número de amostras e parâmetros, com a finalidade explicar esses parâmetros e amostras, dimensionando-os e condensando a informação contida nos mesmos em um conjunto de parâmetros estatísticos com a menor perda possível de informações dos dados (HAIT et al., 1998).

Em outras palavras, a função da ACP é fornecer uma transformação matemática apropriada com o intuito de remover as correlações existentes nos dados de entrada em relação aos dados de saída, permitindo, assim, a visualização global dos dados no espaço n-dimensional através de pequenos números de gráficos bi ou tridimensionais (ESBENSEN; SCHONKOPF; MIDTGAARD, 1994). Com esta redução dos dados, torna-se possível

identificar padrões anteriormente não visualizados, por possuírem alta correlação entre os mesmos. Portanto, a ACP é a técnica estatística utilizada pra analisar dados multivariados.

A ACP produz uma transformação linear de variáveis originais em novas variáveis, de tal modo que a primeira nova variável computada seja responsável pela maior variação possível existente no conjunto de dados, a segunda pela maior variação possível restante, e assim por diante, até que toda a variação do conjunto tenha sido explicada (CRÓSTA, 1992).

Crósta (1992) explica que o conjunto de dados de saída a ser processado na matriz matemática gerada é denominado de Componentes Principais (CPs), que são calculadas uma a uma, em ordem decrescente de variância (informação) total, até que o número de CPs calculadas seja suficiente para uma descrição adequada do conjunto de dados. A percentagem de informação (autovalores) explicada por cada componente principal indica quanto da variação total original dos dados ficaram retidas em cada componente.

O primeiro conjunto de saída é denominado de CP1, o segundo denominado de CP2, o terceiro CP3, e assim por diante. A CP1 irá conter a informação estatística que é comum a todas as amostras originais e, à medida em que se aumentam o número de componentes principais geradas, as informações que elas geram são cada vez menos significantes. Em muitos casos, em apenas duas ou três das primeiras componentes principais são obtidas mais do que 80% da informação, podendo ser usadas para representá-las (MOITA NETO; MOITA, 1998).

O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observações dos pontos no espaço n-dimensional. Esses gráficos apresentam informações úteis sobre tendências e características da estrutura dos dados, tais como agrupamento de amostras e variáveis e caracterização das amostras que não se encaixam no modelo (SENA et al., 2000).

As entidades matemáticas que caracterizam as componentes são: o vetor dos pesos ("loadings"), o vetor dos escores ("scores") e a variância descrita. Os escores (autovetores) são as coordenadas dos dados nas componentes principais (CPs) e definem as projeções (localização) dos objetos ao longo desses novos eixos, ou seja, representam a contribuição de cada imagem original a cada CP e podem ser positivos ou negativos devido ao reposicionamento da origem da distribuição dos N parâmetros. Os autovalores, então,

representam as componentes principais e são resultado do carregamento dos variáveis originais em cada um deles.

Os pesos de um CP são os seus cossenos diretores relativos ao sistema de eixos originais e indicam a contribuição de cada variável original na ACP. Eles podem ser interpretados como uma medida da correlação entre as variáveis e as componentes principais. Quanto maior o peso (em valor absoluto) de uma variável na combinação linear, do ponto de vista estatístico, mais esta variável tem em comum com a componente e maior será a influência desta sobre a componente principal (SHARAF; ILLMAN; KOWALSKI, 1986).

Portanto, o objetivo da ACP é verificar se diante de uma variação total de um conjunto original de informações um pequeno número das primeiras componentes principais conseguem explicar tal variação (JOLLIFFE, 2002). É um dos métodos mais utilizados para a descorrelação de dados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de resíduos, como manipueira, vinhaça e resíduo de fritura de óleos vegetais na produção de biossurfactantes através de micro-organismos isolados de material em decomposição e ensaios de fermentação, verificando a estabilidade de emulsificação e a redução da tensão superficial.

3.2 Objetivos específicos

- * Crescer, isolar e caracterizar micro-organismos a partir de resíduos de manipueira, vinhaça e resíduos de frituras de óleos vegetais;
- Selecionar dentre os micro-organismos isolados aqueles com potencial para a biodegradação;
- * Obter e caracterizar físico-quimicamente os resíduos;
- * Estudar a produção dos biossurfactantes;
- * Avaliar a produção de biossurfactantes utilizando vinhaça, manipueira e óleo residual de fritura como substratos;
- * Estudar o potencial para biorremediação.

4 METODOLOGIA

Os resíduos agroindustriais, manipueira e vinhaça, assim como o óleo vegetal residual de frituras, foram adquiridos em indústrias da região e de um restaurante, respectivamente, e o solo usado para a contaminação das amostras coletado nas proximidades do Laboratório de Ensino em Engenharia Química (LEEQ) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), todos estes situados na cidade de Maceió.

4.1 Crescimentos, isolamento e caracterização dos micro-organismos

O preparo das amostras para o crescimento e isolamento microbiano foi realizado colocando-se 5mL do resíduo agroindustrial em contato com 1g de solo, sendo posteriormente cobertos com gaze para minimizar os riscos de contaminação, homogeneizado e mantido em repouso por três dias, acondicionados em ambiente limpo e seco à temperatura ambiente.

Para o crescimento, as três amostras de resíduo foram submetidas à metodologia das diluições seriadas, em solução salina 0,85% estéril, até a ordem de 10⁻⁵. Alíquotas de 0,5 mL das diluições foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ágar batata dextrose (PDA) e plaqueadas pela técnica de espalhamento com alça de Drigalsky, sendo incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 3 a 5 dias.

O isolamento das colônias de bactérias, fungos filamentosos e leveduras morfologicamente distintas foi realizado em duplicata, com o auxílio de uma alça de níquel cromo, transferindo assepticamente as colônias isoladas para tubos de ensaio contendo os meios ágar nutriente (AN) e ágar sabourad (AS).

No trabalho foram utilizados três micro-organismos (C2, C9 e C10) isolados em pesquisas anteriores pelo LEEQ crescidos em meio YPDA (Yeast-Peptone-Dextrose-Agar) e AN. A composição dos meios de cultura é apresentada na Tabela 1.

| Tabela 1-Composição química | a (g/L) dos meios de cultura usados no estudo. |
|-----------------------------|------------------------------------------------|
|-----------------------------|------------------------------------------------|

| Agar batata dextrose (PDA) | | Agar nutriente (A) | N) | Agar sabourad (A | .S) | YPDA | |
|---------------------------------|----------|----------------------------------|--------|--------------------------------|----------|------------------------|----------|
| Caldo de batata | 140 | Extrato de carne | 3 | Dextrose | 40 | Extrato de levedura | 10 |
| Dextrose Agar bacteriológico | 10 20 | Peptona NaCl | 5 3 | Peptona Agar bacteriológico | 10 20 | Peptona Dextrose | 20 20 |
| | | Na ₂ HPO ₄ | 2 | | | Ágar bacteriológico | 20 |
| | | Agar bacteriológico | 20 | | | 2 | |
| pH 5,5 – 5,7 | | pH 6,8 – 7,0 | | pH 5,4 – 5,8 | | pH 5,0 – 5,5 | |

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Para a manutenção da viabilidade celular, as culturas foram conservadas em tubos inclinados em meio AN, AS e YPDA e repicadas frequentemente para evitar contaminações pelo manuseio. Os tubos foram armazenados em geladeira a 4°C.

As culturas obtidas foram identificadas microscópica e visualmente, distinguindo características como coloração, aspecto da colônia e formato das extremidades celulares, teste de KOH 3% (hidróxido de potássio) e de catalase, na presença de peróxido de hidrogênio. Para a avaliação das bactérias, realizou-se, também, o teste de coloração de Gram.

Para a análise de Gram, foi realizado um esfregaço da cultura em lâmina, sendo em seguida fixado com calor. Foram aplicados, sequencialmente e em tempos padronizados, a solução cristal violeta (corante primário), o lugol (fixador), a solução álcool-cetona 1:1 (descolorizador) e, por fim a solução de safranina (corante secundário). Após secagem, examina-se a lâmina em microscópio óptico sob objetiva de 100 em óleo de imersão. As bactérias coradas de rosa são as Gram negativas, enquanto as de cor violeta são denominadas de Gram positivas (FREITAS; PICOLI, 2007).

O teste do hidróxido de potássio (KOH) é uma das técnicas que auxiliam a identificação de bactérias. Em uma lâmina de microscopia, adicionaram-se duas gotas de uma solução de KOH a 3%. Com o auxílio de uma alça de semeadura coletou-se a colônia a ser testada e a misturou com a solução de KOH na lâmina por 30 segundos. Durante a mistura, deve-se erguer a alça cerca de 1 a 2 cm da superfície da lâmina observando-se se há fios de material viscoso pendentes. Se a bactéria for verdadeiramente Gram-negativa, o KOH irá romper sua parede celular e liberar seu DNA que será observado como fios viscosos. Se a bactéria for Gram-positiva, não haverá a formação de fios (GREGERSEN, 1978).

O teste de catalase, utilizando o peróxido de hidrogênio, auxilia a verificar o metabolismo oxidativo da bactéria, através da liberação de bolhas quando o reagente entra em contato com a suspensão de células (BENNETT; LANCETTE, 2001).

4.2 Teste de biodegradabilidade

Para verificar se os micro-organismos isolados têm o potencial de produzir biossurfactantes, foi realizada uma triagem inicial por meio da técnica de biorremediação do petróleo, baseada no uso do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON; DUSAI e DESAI, 1993). Neste teste, durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato a partir da observação de mudança de coloração do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido).

Das colônias puras, foi preparada uma suspensão celular com meio BH (Bushnell-Hass) e soluções do meio com petróleo em concentrações de 0,2%, 0,6% e 1%, homogeneizadas antes da realização do teste. O meio BH foi composto, em g/L, por: MgSO₄.7H₂O, 0,2; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KH₂PO₄, 1,0; K₂HPO₄, 1,0; NH₄NO₃, 1,0 e FeCl₃, 0,05.

Os testes foram realizados em placas de acrílico (tipo ELISA) com 96 poços, ilustrada na Figura 12 Para a montagem dos poços, foi dispensado em cada poço 25µL da suspensão celular de cada isolado, acrescido de 25µL de meio BH contendo 10 µL da fonte oleosa nas três diferentes concentrações de petróleo para cada amostra e 10µL do indicador DCPIP. As placas foram incubadas em agitador orbital (shaker) à 30°C e 100 rpm (rotações por minuto) e avaliadas a cada duas horas para a verificação da mudança da coloração do indicador DCPIP. Os experimentos foram realizados em duplicata, durante seis dias e acompanhados a cada duas horas.



Figura 12-Microplaca tipo ELISA.

Fonte: Analiticaweb.

4.3 Obtenção e caracterização físico-química dos resíduos

A caracterização físico-química dos efluentes agroindustriais foi realizada com análises de pH, sólidos totais fixos e voláteis, demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total a partir do Standard Methods - Methods of Water and Wastewater (APHA, 1995) e AOAC (1984).

4.3.1 Determinação do pH

Foi feita eletronicamente, com a utilização de um potenciômetro e eletrodo. O equipamento foi aferido em soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0.

4.3.2 Determinação dos sólidos solúveis

Foi realizada por gravimetria, baseada na obtenção de resultados por meio da diferença de peso antes e após o processo de evaporação da amostra em estufa a 105°C.

4.3.3 Determinação da DQO

A determinação da Demanda Química de Oxigênio correspondeu à oxidação química da matéria orgânica, obtida através de um oxidante forte, o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em meio ácido, a elevada temperatura. A curva padrão de DQO para a análise espectrofotométrica foi realizada com soluções de biftalato de potássio de concentração conhecida.

4.3.4 Determinação de nitrogênio total

Foi realizada pelo método de Kjedahl, idealizado em 1883, segundo metodologia da AOAC (1984), e baseada em três etapas: digestão em ácido sulfúrico concentrado em presença de catalisador, destilação em ácido bórico 4% após neutralização com hidróxido de sódio 40% e titulação em ácido clorídrico 0,05N. A matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio existente é finalmente transformado em amônia. Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas aproximadamente 16%, utiliza-se o fator empírico 6,25 para transformar o número de g de nitrogênio encontrado em número de g de proteínas.

O índice de acidez, saponificação e determinação da densidade foram realizados de acordo com metodologias do Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.3.5 Determinação do índice de acidez

Fornece informações sobre o estado de conservação do óleo e é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e animais e gorduras animais. Foram pesadas 2 g de amostra em frasco erlenmeyer de 250 mL, adicionados 25 mL de solução álcool:éter (2:1) neutra e 2 gotas do indicador fenolftaleína. A amostra foi homogeneizada e titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até o aparecimento da coloração rosa, a qual deve persistir por 30 segundos.

4.3.6 Determinação do índice de saponificação

Quantidade de álcali necessária para saponificar uma quantidade definida de amostra, é aplicável a todos os óleos e gorduras. Primeiramente, a amostra foi filtrada em papel de filtro para a remoção de impurezas e traços de umidade. Em seguida, foram pesadas em um balão de fundo chato com boca esmerilhada 4 a 5 g de amostra e adicionados 50 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio. Um branco também foi preparado, substituindo-se a amostra por água. O balão foi conectado a um condensador de bolas e deixado ferver suavemente em manta de aquecimento, por aproximadamente 1 hora, até completa saponificação da amostra. Após o resfriamento do balão, lavou-se a parte interna do condensador com um pouco de água, adicionou-se 1 mL do indicador fenolftaleína e titulou-se com solução de ácido clorídrico 5 N até o desaparecimento da cor rosa.

4.3.7 Determinação da densidade

Foi realizada em picnômetro de 50 mL com junta esmerilhada e sem termômetro. A medida de temperatura foi realizada à parte.

4.4 Produção de biossurfactante

Após a seleção dos micro-organismos, testes de fermentação para a produção de biossurfactante foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL, com concentração celular de 10⁴ cél/mL, sob agitação orbital 100 rpm e temperatura de 30°C.

As setes diferentes formulações incrementadas com fontes carbono do meio Bushnell-Hass foram: glicose, óleo + glicose, vinhaça, óleo + vinhaça, manipueira, óleo + manipueira, vinhaça + manipueira.

Durante os ensaios acompanhou-se, através de retiradas assépticas periódicas de amostras, a concentração celular (X), a concentração de açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART), o °BRIX, a concentração de proteínas totais (P) e a estabilidade de emulsificação (EE), além da determinação da tensão superficial.

As análises foram realizadas de acordo com Standard Methods - Methods of Water and Wastewater (APHA, 1995) e Instituto Adolfo Lutz (2005).

4.4.1 Determinação da concentração celular

A concentração de células (X) foi determinada através da medição da absorvância do meio de cultura no espectrofotômetro a 600 nm e convertida para concentração através da curva de calibração obtida por gravimetria (peso seco).

Os meios em que ocorreram os processos fermentativos para a produção de biossurfactantes

Para a análise de peso seco, após a fase exponencial de crescimento, 20 mL do meio de cultivo (V_o) foram colhidos com agitação constante e centrifugados a 3000 rpm por 5 mim, lavados com NaCl 0,85% e ressuspensos em um pequeno volume de água destilada.

A solução de células assim obtida foi transferida para um recipiente de papel de alumínio previamente pesado (M_p) e levada para estufa a até apresentar peso constante (M_a) .

Paralelamente, alíquotas do meio de cultivo foram diluídas em água destilada, obtendo-se concentrações de amostra (X_m) de 0.02 a 0.4 g/L, e medidas suas absorvâncias a 600 nm.

A concentração de células em cada solução é dada pela expressão:

$$X = \frac{(M_a - M_p)}{V_o}.X_m \tag{1}$$

onde os valores de Ma, Mp, Vo e Xm forão obtidos como indicado no texto.

A curva de calibração foi obtida a partir da representação das medidas de absorbância em relação à concentração de células nas amostras, como mostra o exemplo da Figura 13 Para determinar a concentração de células nos meios de cultivo, as medidas de absorbância serão realizadas, observando-se sempre a faixa de linearidade da curva.

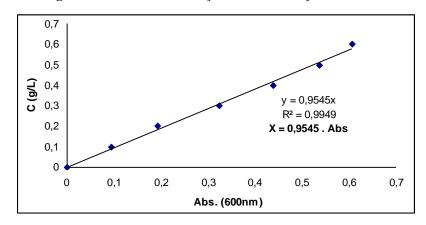


Figura 13-Curva de calibração da concentração de células.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

4.4.2 Determinação dos açúcares

As determinações de açúcares redutores e redutores totais foram realizadas pelo método do DNS, proposto por Miller (1959). Para os açúcares redutores, a amostra foi filtrada e submetida a uma reação em presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Para o preparo do reagente de DNS, dissolve-se à temperatura ambiente 1 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 20 mL de NaOH 2 N e 50 mL de água destilada. Adiciona-se 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio – C₄H₄KNaO₆.4H₂O) somente quando o DNS estiver totalmente dissolvido, completando o volume para 100 mL com água destilada.

A reação de DNS é feita com a transferência de 0,25 mL da amostra para um tubo de ensaio com tampa e adicionado 0,5 mL de água destilada. Adiciona 0,25 mL do reagente de DNS e leva-se a amostra para banho fervente por 5min, permitindo que ocorra a reação entre a glicose e o DNS. O tubo é retirado e colocado em banho de gelo, ajustando-se o volume com água destilada para 5 mL e lendo-se a absorbância a 540nm, tendo como padrão concentrações conhecidas de glicose. A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose, tem-se a equação da reta que permite calcular a concentração de glicose em cada amostra. Para "zerar" o espectrofotômetro e ler as absorvâncias, será necessário fazer um branco, substituindo-se na reação de DNS a amostra por água destilada.

Para a determinação de açúcares redutores totais, foi necessária a hidrólise e neutralização da amostra. Um volume de amostra é transferido para um tubo e adicionados 5 mL de H₂SO₄ 1,5M, levando a banho fervente por 30 min, sob agitação ocasional, para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores (ao menos a cada 5 min). O tubo foi resfriado, adicionado 2 gotas de fenolftaleína e neutralizado com NaOH 10%. A mesma foi filtrada em papel qualitativo e do sobrenadante se realizará a reação com o DNS.

A Figura 14 e as equações para a determinação de açúcares redutores e redutores totais a partir da curva de calibração com concentrações conhecidas de glicose são apresentadas abaixo.

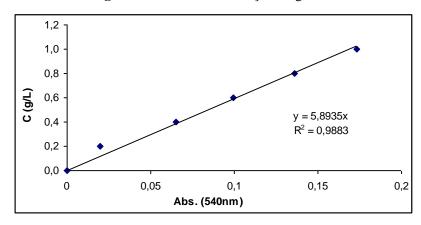


Figura 14-Curva de calibração de glicose

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

$$AR(g/L) = fator da curva padrão.diluição. Absorbância$$
 (2)

$$ART(g/L) = diluição de hidrólise. Absorbância fator da curva padrão$$
 (3)

4.4.3 Determinação do teor de sólidos solúveis

A determinação dos sólidos solúveis, o BRIX°, foi medida por refratometria, em leitura direta da amostra em refratômetro digital.

4.4.4 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), tendo como base uma curva padrão com diferentes concentrações de albumina do soro bovino (BSA) em presença de solução corante. A solução corante foi preparada dissolvendo-se 50 mg de azul brilhante de Coomassie G (Sigma) em 25 mL de etanol 95%, sob agitação constante. Serão adicionados, então, 50 mL de ácido fosfórico 85% e 500 mL de água destilada. A solução foi mantida com agitação por no mínimo 1 hora e, então, filtrada. A solução pode ser armazenada a 4°C e, sempre antes de ser utilizada, deve ser filtrada.

A curva de calibração foi construída utilizando soluções de BSA na faixa de 0,02 g/L a 0,10 g/L. Os pontos da curva foram determinados fazendo-se uso de misturas contendo alíquotas de 0,5 mL das soluções de BSA e de 5 mL da solução corante. Após 10 minutos de contato, procede-se à leitura da absorvância em espectrofotômetro a 600 nm, tomando-se como zero a absorvância de uma amostra contendo 0,5 mL de água e 5 mL da solução

corante.

A Figura 15 para a determinação de proteínas a partir da curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA é apresentada abaixo.

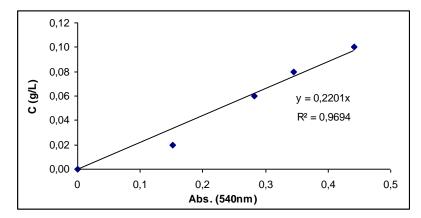


Figura 15-Curva de calibração de BSA

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

4.4.5 Determinação do índice de emulsificação

A avaliação da capacidade dos isolados que apresentaram resultados positivos quanto à produção de biossurfactante de formar emulsão, assim como a avaliação da estabilidade da emulsão formada, foram realizadas utilizando-se culturas crescidas sob as mesmas condições utilizadas no teste qualitativo da biorremediação do petróleo.

As células de cada uma das culturas foram centrifugadas (3000 rpm por 20 min). Foi transferido 2 mL do sobrenadante para um tubo de centrífuga e misturados a 2 mL de querosene ou hexano, nas concentrações que se foram observadas o maior potencial de serem biodegradadas. A mistura foi agitada por dois minutos e o tubo com a emulsão formada foi tampado deixado em repouso por dois minutos, medindo-se, a seguir, o volume da emulsão formada (DAS et al., 1998). A estabilidade da emulsão é avaliada em intervalos de tempo até 48 h após o início do ensaio. O volume da emulsão foi determinado medindo-se a altura da camada emulsionada (cm), dividindo-se a mesma pela altura total do líquido e multiplicando-se o valor obtido por 100, como mostra a equação 4.

$$VE(\%) = \frac{\text{altura da emulsão (mm). área da seção transversal (mm}^2).100}{\text{volume total (4000 mm}^3)}$$
(4)

A emulsão foi considerada estável se seu volume, 24 horas após a sua formação, corresponder a 50% ou mais de seu volume original (WILLUMSEM; KARLSON, 1997).

A estabilidade da emulsão EE (%) após o tempo t foi quantificada pela equação 5.

$$EE(\%) = \frac{VE_{t}(\%).100}{VE_{0}(\%)}$$
 (5)

onde:

VE_t(%) = volume de emulsão medida no tempo t

 VE_0 (%) = volume de emulsão medida no tempo zero

As emulsões formadas foram comparadas às formadas por um surfactante sintético, o lauril sulfato de sódio (SLS), à concentração de 1 % (p/v) em água deionizada. Essa concentração de SLS foi escolhida por ser maior do que a sua concentração micelar crítica, estimada em 0,18% (BODOUR; MILLER-MAIER 1998).

4.4.6 Determinação da tensão superficial

A determinação de produção de biossurfactante foi realizada medindo-se as tensões finais do caldo de cultivo livre de células, utilizando-se o tensiômetro *K100 Krüss*, segundo o método da placa e anel de De Nöuy (FOUNTAIN et al., 1991). Para cada amostra analisada foram necessários 30 mL de sobrenadante livre de células, mantidos a 30°C. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) na Universidade Federal de Sergipe, sob a responsabilidade do professor Dr. Roberto Rodrigues de Souza.

4.5 Utilizações dos resíduos agroindustriais manipueira, vinhaça e óleo residual de fritura como substratos para a produção de biossurfactantes

Os micro-organismos isolados foram inicialmente ativados para a garantia de uma

viabilidade celular através da inoculação em meio mineral de cultura (MM) por Bodour e Miller-Maier (1998). O meio MM é composto, em g/L, por: NH₄Cl, 1,0; KH₂PO₄, 1,5; Na₂HPO₄, 4,0; MgSO₄.7H₂O, 0,2; CaCl₂.2H₂O, 0,013; citrato de ferro (III) amoniacal, 0,005; Agar, 15,0, com pH de 6,8-7,0.

As sete formulações de meio de cultura que foram realizadas na avaliação da produção de biossurfactantes, a saber:

 $T_1 = MM$ suplementado com glicose 2%, como controle do experimento;

T₂ = MM suplementado com manipueira, em substituição a água;

T₃ = MM suplementado com vinhaça, em substituição a água;

T₄ = MM suplementado com óleo residual de fritura, em substituição a água;

 T_5 = meio composto apenas com manipueira e vinhaça, na relação de 1:1 em massa de açúcares totais;

 T_6 = meio composto apenas como manipueira e óleo residual de fritura, na relação de 1:1 em massa de açúcares totais;

 T_7 = meio composto com vinhaça e óleo de fritura, na relação de 1:1 em massa de açúcares totais.

As fontes de carbono foram fornecidas com a mesma concentração total de açúcares, sendo ajustadas pela fonte pura de vinhaça, manipueira e óleo residual de fritura que fornece a menor porcentagem de açúcares totais. O pH deve ser ajustado entre 6,8 e 7,0, de acordo com o pH do MM.

4.5.1 Tratamento dos resíduos

Nas formulações dos meios contendo vinhaça e manipueira, houve a necessidade de ajustes em suas fontes de carbono, de acordo com a concentração total de açúcares da vinhaça, pois a mesma possui uma porcentagem 10 vezes inferior aos açúcares totais contidos na manipueira.

A vinhaça e a manipueira, antes das suas utilizações como fonte de carbono para

suplementar o meio mineral, foram previamente tratadas através do aquecimento, centrifugação e esterilização para se eliminar os sólidos insolúveis dos mesmos, seguindo a metodologia de Nitschke e Pastore (2006).

Esse tratamento consiste na fervura no aquecimento dos resíduos até a fervura e resfriados à temperatura ambiente e centrifugados por 3.000 rpm por 20 minutos, para a remoção do amido, no caso da manipueira, e de outros sólidos insolúveis, e armazenadas até o momento das suas utilizações, antes da qual passaram por um processo de autoclavagem a 121°C por 15 minutos (NITSCHKE et al., 2004).

Para a manipueira, contudo, teve-se um maior cuidado no seu pré-tratamento, pois os glicosídeos presentes neste resíduo, no processo fermentativo, podem se hidrolisar liberando cianeto, fonte tóxica que pode inviabilizar o crescimento microbiano (CEREDA, 1994).

4.6 Isolamento dos biossurfactantes

Ao final do processo, o líquido metabólico foi centrifugado e submetido ao processo de extração, tendo o pH ajustado para 2,0 com o auxílio de solução de HCl 6M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após o repouso de 24 horas a -15°C, a amostra foi centrifugada e lavada com metanol gelado, sendo levada à secagem na temperatura de 37°C até peso constante.

4.7 Potencial para biorremediação

A capacidade de remoção de solos contaminados com óleo, amostra cedida pela empresa PETROBRÁS, foi feita de acordo com metodologia descrita por Luna, Sarubbo e Campos-Takaki (2009). A adequação do biossurfactantes para a recuperação de óleo como o petróleo foi realizada utilizando 180 g de areia da praia impregnadas com 15 mL do óleo. Frações de 10 g da areia contaminada foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL, nos quais 30 mL de água destilada foram adicionados como controle negativo, 30 mL de SLS® foram adicionados como controle positivo e 30 mL de solução aquosa de biossurfactante a uma concentração de 1,5 %.

No tratamento, as amostras foram incubadas em um agitador orbital (shaker) a 110 rpm por 24 horas a 24 °C e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos para a separação da solução de lavagem e da areia.

A quantidade de óleo que permanecerá na areia após o impacto de biossurfactante, por gravimetria, foi determinada como a quantidade de material extraído da areia com hexano (NISTCKE; PASTORE, 2002).

4.8 Análise de componentes principais (ACP)

O programa THE UNSCRAMBLER® versão 9.2 foi utilizado para que de a ACP se iniciasse com o cálculo de uma matriz de variâncias-covariâncias. O primeiro valor a ser determinado corresponderá á maior porcentagem da variabilidade total presente e assim sucessivamente. Auto-escalonamento foi o pré-processamento utilizado no tratamento dos dados em função das diferentes ordens de grandeza das variáveis estudadas.

A matriz de carregamentos geradas de cada variável nas componentes principais ao ser multiplicada pela matriz original de dados fornecerá a matriz de contagens (escores) de cada caso em relação às componentes principais. Esses valores poderão ser dispostos num diagrama de dispersão, onde os eixos são as duas componentes mais importantes, de acordo com sua contribuição estatística, e assim mostrar o relacionamento entre os casos condicionados pelas variáveis medidas no estudo (BERNARDI et al., 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais

5.1.1 Vinhaça

A vinhaça utilizada para o isolamento dos micro-organismos foi gentilmente cedida pela Usina Cachoeira. A mesma foi caracterizada físico-quimicamente e comparada com valores encontrados na literatura, como mostra a Tabela 2

Tabela 2-Caracterização físico-química da vinhaça e comparação com a literatura.

| Determinações | Resultados obtidos | CORTEZ et al., 1992 citado por SALOMON, 2007 | NETO & NAKAHODO, 1995 | |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|--|
| рН | 4,47 | $4,4 \pm 4,6$ | 3,5 - 4,9 | |
| Sólidos totais (mg/L) | 55728 ± 3785 | 52700 | 10780 - 38680 | |
| Sólidos totais fixos (mg/L) | 16921 ± 128 | 12700 | - | |
| Sólidos totais voláteis (mg/L) | 38807 ± 3657 | 40000 | - | |
| DQO (mg O_2/L) | 38911,2 | 45000 | 9200 – 97400 | |
| Cloreto (mg Cl/L) | 378,7±41 | - | 480 – 220 | |
| Fósforo (mg P/L em PO ₄) | $17,56 \pm 0,88$ | 9-200 (mg P/L em P_2O_5) | 18 - 88 | |
| Nitrogênio amoniacal (mg N/L em NH ₃) | $15,9\pm5,5$ | - | 1 – 188 | |
| Nitrogênio total (mg N/L) | 711 ± 153 | 480 - 710 | 90 – 885 | |

Fonte: Acervo do LEEQ

As análises da amostra de vinhaça utilizada no trabalho encontram-se compatíveis com os valores da caracterização físico-química de Cortez, Magalhães e Happi (1992) citado por Salomon (2007) e Neto e Nakahodo (1995). Algumas diferenças de dados se devem à variação natural da concentração de vinhaça de usina pra usina, em função do tipo de mosto, da moagem de diferentes variedades, diferentes índices de maturação da cana, solos, níveis de fertilidade, entre outros fatores.

5.1.2 Manipueira

A amostra de manipueira foi coletada em casa de farinha da região de Junqueiro, interior alagoano. A variedade de mandioca no estudo foi a Sergipana, cujo procedimento de

prensagem para a obtenção da manipueira foi mecânico. A casa de farinha, o processo de prensagem mecânica e a caixa de armazenamento da manipueira da cooperativa que utiliza a mandioca Sergipana são apresentados na Figura 16.

Figura 16-Casa de farinha, extração da manipueira e caixa de armazenamento.







Fonte: Acervo do LEEQ

A caracterização físico-química da manipueira é apresentada na Tabela 3 O pH da manipueira coletada encontra-se dentro do intervalo obtido pela caracterização da manipueira recém coletada da fábrica de farinha de mandioca por Leonel e Cereda (1996) e DQO condizente e sólidos totais, voláteis e fixos com valores fora do intervalo de máximo e mínimo em estudos realizados por Feiden (2001), Parizotto (1999) e Anrain (1983).

Tabela 3-Caracterização físico-química da manipueira obtida da variedade de mandioca Sergipana.

| Ph | Sólidos Totais | Sólidos Totais Fixos | Sólidos Voláteis | DOO (mg O /I) |
|------|----------------|----------------------|------------------|----------------------------|
| PII | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | DQO (mg O ₂ /L) |
| 4,24 | 92900 | 1500 | 91400 | 99579,2 ± 42750,8 |

Fonte: Acervo do LEEQ

De acordo com Barana (2000), a composição da manipueira pode se apresentar de forma variável, pois é dependente das características das raízes, podendo ser influenciada por vários fatores, como variedade, tipo de solo, condições climáticas, entre outros.

Conforme Feiden (2001), para o caso específico da mandioca, estudos efetuados para o tratamento da manipueira são predominantemente de processos biológicos anaeróbicos, embora trabalhos isolados tenham sido efetuados utilizando outros processos.

5.1.3 Óleo residual de fritura

O resíduo obtido de lanchonete dentro da própria Universidade foi caracterizado

físico-quimicamente de acordo com o índice de acidez, índice de saponificação, densidade e pH e foram comparados com valores encontrados na literatura de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4- Caracterização físico-química do óleo residual de fritura e comparação com a literatura.

| Determinações | Resultados obtidos | MENDONÇA et al., 2008 | SANTOS et al., 2007 | PEREIRA et al., 2010 |
|---------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|
| рН | 6,0 | - | 7,69 | - |
| Densidade (g/mL) | 0,96 | - | 0,92 | - |
| Índice de saponificação (mg KOH/g óleo) | 108,41 | - | - | 100,35 |
| Índice de acidez em termos de ácido oléico (%) | 0,046 | 0,14 | - | - |

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

As diferenças nos valores de acidez mostrados na Tabela 4 indicam que o aumento da acidez da amostra de Mendonça et al. (2008) provoca o desenvolvimento de reações hidrolíticas, com a produção de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, de diglicerídeos, ocorrido devido à presença de água e de alta temperatura, pois, quanto maior o percentual de água no alimento, mais rapidamente ela ocorre (CELLA; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2002). O índice de acidez encontrou-se dentro das normas, em termos de percentuais de ácido oléico, no qual se segue a legislação dos Estados Unidos, o mais exigente dos países, quanto à qualidade do óleo de fritura, sendo o valor máximo para o índice de acidez de 1% (FIRESTONE; BLUMENTHAL, 1991).

Ao nível de Brasil, o teor máximo permitido é 0,3 g de ácido oléico/100g, ou seja, 0,3%, valor que serve apenas como parâmetro por não haver legislação específica para fritura (ANVISA, 1999).

O índice de saponificação dos triacilgliceróis varia com a natureza dos ácidos graxos constituintes do óleo e, por isso, a diferença de valores observados por Pereira et al. (2009). Quanto menor for o peso molecular do ácido graxo, tanto maior será o índice de saponificação (CONCEIÇÃO et al., 2005).

Conforme Ribeiro e Seravalli (2004), a reação de saponificação pode estabelecer o grau de deterioração e a estabilidade, verificar se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificar possíveis fraudes e adulterações.

A densidade relativa, que determina a razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume a 25°C, e o pH da amostra de óleo de fritura são, respectivamente, 0,96 g/mL e 6,0, resultados estes próximos ao citado por Santos et al. (2007).

5.2 Isolamentos, crescimento e caracterização dos micro-organismos

A partir do isolamento microbiano de resíduos agroindustriais como manipueira, vinhaça e óleo residual de fritura, através da técnica de diluição seriada decimal, foram isolados 50 micro-organismos. O crescimento microbiano se deu em placas invertidas por um período de 3 a 5 dias em estufa bacteriológica à 30°C, nos meios de cultivo ágar nutriente (AN) e ágar Sabourad (AS). Dentre estes, 32 mantiveram sua viabilidade celular. A Figura 17 ilustra placas que passaram pelo teste de viabilidade a partir da técnica de estriamento, na qual consiste no esgotamento dos micro-organismos contidos em alça semeando-os de forma contínua nas placas.

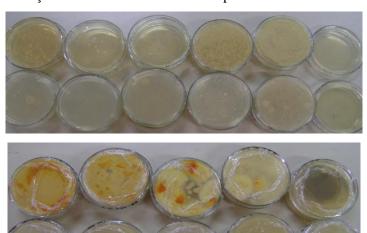


Figura 17-Visualização de colônias desenvolvidas após o estriamento e viabilidade celular.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A Tabela 5 apresenta as características dos 32 micro-organismos isolados, além dos micro-organismos C2, C9 e C10.

Tabela 5-Caracterização dos micro-organismos isolados a partir dos resíduos em estudo.

| Cultura | Resíduo | Diluição | Meio de cultivo | Micro-organimo | Forma | Gram | Catalase | KO |
|---------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|-------------------|------|----------|----|
| 2 | Manipueira | 10-1 | AS | Levedura | | | | |
| 3 | Manipueira | 10-5 | AS | Levedura | | | | |
| 5 | Manipueira | 10-5 | AS | Levedura | | | | |
| 7 | Manipueira | 10-5 | AS | Bactéria | coco | - | + | + |
| 8 | Manipueira | 10-5 | NA | Levedura | | | | |
| 9 | Manipueira | 10-2 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 10 | Manipueira | 10-5 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 11 | Manipueira | 10-3 | NA | Bactéria | coco | - | - | + |
| 12 | Manipueira | 10-4 | NA | Bactéria | coco | - | + | + |
| 13 | Manipueira | 10-2 | NA | Bactéria | coco | + | - | - |
| 14 | Manipueira | 10-3 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 15 | Manipueira | 10 ⁻⁵ | NA | Bactéria | bastão | + | + | - |
| 16 | Manipueira | 10-2 | NA | Bactéria | bastão | + | + | - |
| 17 | Manipueira | 10 ⁻⁵ | NA | Levedura | | | | |
| 18 | Manipueira | 10-2 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 19 | Manipueira | 10 ⁻⁵ | NA | Levedura | | | | |
| 21 | Manipueira | 10-1 | NA | Bactéria | bastão | + | - | - |
| 22 | Vinhaça | 10-1 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 25 | Vinhaça | 10-3 | NA | Bactéria | coco | - | + | + |
| 26 | Vinhaça | 10-5 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 30 | Vinhaça | 10-5 | AS | Bactéria | bastão | + | + | - |
| 31 | Vinhaça | 10-5 | AS | Bactéria | coco | + | + | - |
| 33 | Óleo | 10-4 | NA | Bactéria | coco | - | + | + |
| 35 | Óleo | 10-2 | NA | Bactéria | bastão | - | + | + |
| 37 | Óleo | 10-2 | NA | Bactéria | coco | - | + | + |
| 38 | Óleo | 10-5 | NA | Bactéria | coco | + | + | - |
| 43 | Óleo | 10-2 | NA | Bactéria | bastão | + | + | - |
| 44 | Óleo | 10-5 | AS | Bolor | | | | |
| 46 | Óleo | 10-1 | AS | Bolor | | | | |
| 48 | Óleo | 10-1 | AS | Bactéria | bastão | + | + | - |
| 49 | Óleo | 10-3 | AS | Bolor | | | | |
| 50 | Óleo | 10-4 | AS | Bolor | | | | |
| C2 | Borra de petróleo | 10-4 | YPDA | Bactéria bastão | | + | + | |
| C9 | Borra de petróleo | 10 ⁻³ | YPDA | Bactéria | Bactéria bastão + | | - | - |
| C10 | Borra de petróleo | 10 ⁻³ | NA | Bactéria | bastão | + | - | - |

AN = meio ágar nutriente e AS = meio ágar sabourad

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A Tabela 5 mostra os micro-organismos que se mantiveram viáveis para o estudo, o substrato do qual foi isolado, a diluição decimal da qual foram obtidos e o meio de

crescimento. Para as bactérias, também foram realizados os testes de coloração de Gram, catalase e KOH 3%.

A heterogeneidade dos micro-organismos é de extrema importância para o ambiente, pois a diversidade dos micro-organismos é necessária para as atividades bioquímicas do solo, estando os mesmos envolvidos diretamente em todos os processos biológicos e influenciando processos físicos e químicos (GONZÁLEZ et al., 2001).

Na caracterização morfológica das colônias bacterianas e das leveduras, observaramse tamanho pequeno, bordos lisos em sua maioria e cepas com coloração amareladas, marrons, beges e brancas, apresentando aspectos viscosos e membranosos. Já os bolores apresentaram pigmentação verde, marrom, branca e amarela.

Dos 32 micro-organismos isolados, 17 foram provenientes da manipueira, 5 da vinhaça e 10 do óleo de fritura residual.

Considerando a Tabela 5, a identificação microscópica na manipueira permitiu detectar 6 leveduras (2, 3, 5, 8, 17 e 19) e 11 bactérias (7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 e 21), entre Gram positivas e negativas. Na vinhaça, todos os micro-organismos isolados foram bactérias (22, 25, 26, 30 e 31). No óleo de fritura, conseguiu-se isolar 6 bactérias (33, 35, 37, 38, 43, 48) e 4 bolores (44, 46, 49 e 50).

No teste de KOH, as 7 cepas bacterianas apresentaram a formação do fio (7, 11, 12, 25, 33, 35, 37), confirmando que são Gram-negativas. A detecção visual desse fio é decorrente da parede celular peptidoglicana fina dessas bactérias, composta de lipopolissacarídeos, lipopotreínas e fosfolipídeos, que permite a liberação do material genético da célula devido o contato com a base. Perazzolo (2011) cita que o método do teste de KOH a 3% se faz necessário, pois a coloração de Gram não é uma técnica infalível para a diferenciação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

O teste da catalase auxiliou a identificar que 86,4% das bactérias são catalase-positiva. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999), tais bactérias não esporuladas são as que mais resistem no meio ambiente, podendo sobreviver por meses em amostras clínicas secas, sendo relativamente resistentes ao calor e tolerando por meses concentrações elevadas de sal.

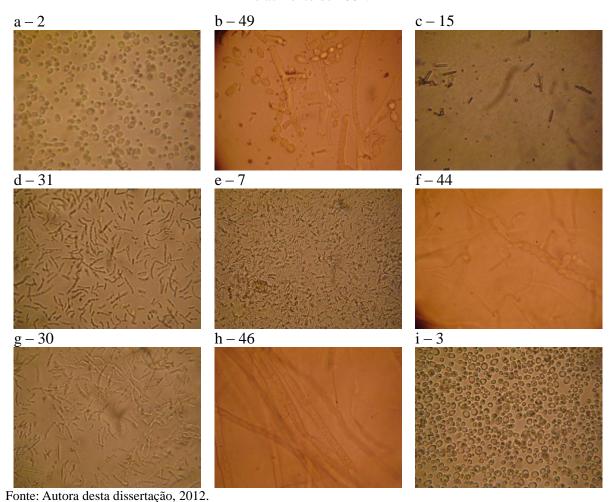
Os micro-organismos C2, C9 e C10 isolados a partir da borra de petróleo são bactérias, com microscopia de bastonete, com aspecto brilhoso, entre bordos redondos e irregulares, sendo o C2 gram negativa e catalase positiva e os isolados microbianos C9 e C10 gram positivos e catalase negativa e positiva, respectivamente.

De acordo com os testes morfológicos realizados, observa-se que há expressão considerável de biodiversidade das cepas isoladas.

Após a distinção morfológica e bioquímica as cepas foram mantidas na coleção do LEEQ, a partir do isolamento em tubos inclinados em AN ou AS.

Na Figura 18 são ilustradas microscopias de cepas de bactérias, leveduras e bolores como exemplos dos isolados obtidos a partir dos resíduos de baixo custo.

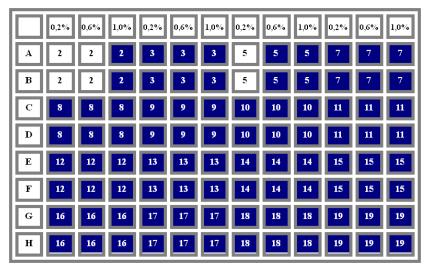
Figura 18-Visualização microscópica de alguns micro-organismos encontrados no isolamento no aumento de 400x.



5.3 Teste de biodegradabilidade

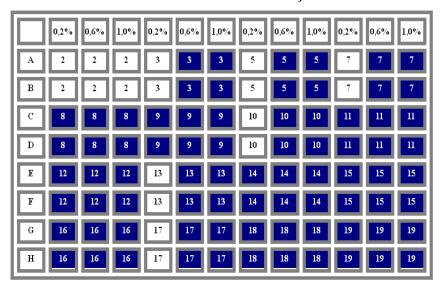
A degradação de diferentes concentrações de petróleo na presença dos microorganismos, realizada em placas de acrílico (tipo ELISA) com 96 poços, foi acompanhada ao longo de 6 dias. As Figuras 19 a 21 apresentam o acompanhamento da biorremediação ao longo do tempo. Os quadros brancos indicam a redução do indicador DCPIP, enquanto os azuis não apresentam mudanças. O número se refere à identificação da cultura.

Figura 19-Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da manipueira, após 2 horas do teste de biorremediação.



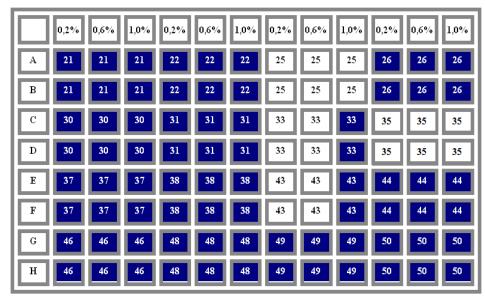
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 20-Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da manipueira, após 4 horas do teste de biorremediação.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 21-Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da vinhaça (da numeração de 22 a 31) e de óleo residual de fritura (da numeração de 33 a 50), após 4 horas do teste de biorremediação.



A cultura 21 foi isolada da manipueira.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

No teste da biodegradabilidade, é importante observar que a quantidade de biomassa deve ser o suficiente para a degradação dos contaminantes, pois baixas populações microbianas podem resultar em significantes períodos de retardo antes do início de uma biodegradação mensurável. Por isto, procurou-se iniciar o teste com a mesma concentração, realizada a partir de suspensão dos micro-organismos em meio BH, composto, em g/L, por: MgSO₄.7H₂O, 0,2; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KH₂PO₄, 1,0; K₂HPO₄, 1,0; NH₄NO₃, 1,0 e FeCl₃, 0,05, e medida de absorvância que variavam de 0,02A a 0,06A.

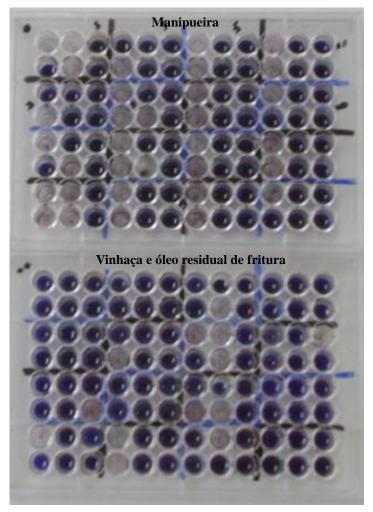
Foram observados os primeiros sinais de redução do indicador DCPIP já nas primeiras 2 horas, com os micro-organismos 2 e 5, isolados da manipueira, Figura 19, conseguindo biodegradar o petróleo em até 0,6% de concentração. Nos poços da microplaca com os micro-organismos provenientes da vinhaça e do óleo de fritura, porém, não houve alteração de cor, permanecendo o meio oxidado com o DCPIP.

A Figura 20 mostra o progresso da biodegradação com os micro-organismos isolados da manipueira após 4 horas de avaliação, onde se observou que 6 isolados microbianos (2, 3, 5, 7, 10, 13 e 17) conseguiram reduzir o DCPIP em até concentrações de 1% de petróleo, como é o caso do micro-organismo 2.

Para a microplaca com os micro-organismos isolados da vinhaça (do 22 ao 31), Figura 5.6, apenas a cultura 25 possui degradação, mas com um alto potencial, reduzindo o DCPIP nas 3 concentrações de petróleo avaliadas, enquanto o óleo residual de fritura (do 33 ao 50), também na Figura 21, possui três culturas microbianas (33, 35 e 43) com menor potencial, degradando as concentrações de 0,2 e 0,6% de petróleo.

As fotos das microplacas após 6 dias de acompanhamento da degradação do petróleo são ilustradas na Figura 22.

Figura 22-Representação da microplaca com os micro-organismos isolados da vinhaça e de óleo residual de fritura, após 4 horas do teste de biorremediação.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Percebeu-se um aumento de degradação das culturas, evidenciando-se o maior potencial dos micro-organismos isolados da manipueira, principalmente na menor concentração de petróleo. As culturas isoladas da vinhaça e do óleo residual também

mostraram um aumento na redução do DCPIP, ainda que mais lento que o observado na manipueira.

Esses resultados são relevantes para várias aplicações dos biossurfactantes, principalmente, indústria petrolífera, onde podem ser utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (BANAT, 1995).

Portanto, dos micro-organismos isolados provenientes da manipueira, 35% apresentaram potencial de biodegradação, sendo os primeiros resultados já observados em apenas 2 horas de contato com o agente oxidante DCPIP. Dos isolados provenientes da vinhaça, apenas 20% conseguiram reduzir o DCPIP, enquanto que para o óleo residual de fritura, 30% dos micro-organimos apresentaram capacidade para biodegradar a fonte oleosa envolvida, ainda que em menor velocidade que os isolados da manipueira.

5.4 Produção de biossurfactante

A partir do teste de biodegradabilidade, mostrado nas Figuras de 19 a 21, foi realizada uma triagem por meio da técnica qualitativa do teste do colapso da gota (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998) para confirmar a produção e a eficiência dos biossurfactantes. O teste foi aplicado nos 11 isolados microbianos (2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 25, 33, 35 e 43) que conseguiram reduzir o DCPIP em concentrações de até 1% de petróleo, além de 3 microorganismos (C2, C9 e C10), isolados em pesquisas anteriores pelo LEEQ, e da levedura *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), gentilmente cedida pelo BIOSE da Escola de Química da UFRJ.

O óleo de soja foi o utilizado para a realização do teste do colapso da gota, apresentado na Figura 23, mostrando-se um bom suporte lipídico, apesar de não ter sido comparado a outros tipos de óleos, para a detecção de produtores de biossurfactantes em tampas de microplacas.



Figura 23-Teste do colapso da gota.

Obteve-se uma leitura confirmativa de todos os micro-organismos, indicando que, além de biodegradar o petróleo também são produtores de biossurfactantes em função da formação de uma gota não deformada e com espalhamento nítido, o que sugerem bons resultados por se tratar de um teste de avaliação visual.

Depois de confirmadas as espécies produtoras de biossurfactantes, o processo de cultivo destas substâncias tensoativas, ilustrado na Figura 24, é iniciado. O micro-organismo (a) é inoculado ao meio mineral suplementado com diferentes fontes de carbono (b) durante 7 dias, sob temperatura e agitação controladas, para a formação dos biossurfactantes (c) e, posteriormente, serem utilizados em diversas análises e aplicações (d).

Das composições entre meio mineral e fontes diferenciadas de carbono os seguintes meios de cultura foram utilizados ao longo do trabalho: glicose (G), vinhaça (V), manipueira (M), óleo + glicose (OG), óleo + vinhaça (OV), óleo + manipueira (OM) e vinhaça + manipueira (VM).

Estes sete meios minerais, suplementados com diferentes fontes de carbono alternativas para o crescimento celular microbiano, foram estudados para a verificação da influência na produção de biossurfactantes, no meio livre de células, no que se refere à quantidade de açúcar redutor (AR), açúcar redutor total (ART), sólidos solúveis totais (°Brix), proteína, capacidade de biorremediar o petróleo de areia da praia contaminada por tal óleo, reduções de tensões superficiais e capacidade de estabilizar emulsões quando em contato com querosene ou hexano.



Figura 24-Produção de biossurfactante.

Todas as análises foram realizadas nos sobrenadantes livres de células, provenientes das 14 amostras de micro-organismos (2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 25, 33, 35, 43, C2, C9 e C10) selecionados no presente estudo.

5.4.1 Determinação de açúcares redutores (AR)

5.4.1.1 Glicose

O consumo dos monossacarídeos nos 14 sobrenadantes avaliados, provenientes do crescimento microbiano em meio mineral suplementado com glicose 2% e com glicose + óleo (2% de cada fonte de suplementação), é apresentado na Figura 25.

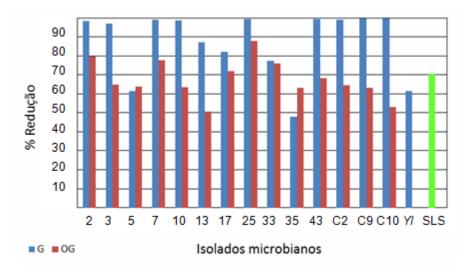


Figura 25-Percentual da redução de AR nos meios de glicose e glicose + óleo.

Para avaliar a eficiência dos micro-organismos isolados, os resultados são comparados com bons produtores de surfactantes, o comercial lauril sulfato de sódio (SLS®) e o produzido pela *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), com a glicose como fonte de carbono.

Observou-se que nos meios contendo apenas glicose a mesma é consumida quase que totalmente durante o processo fermentativo por 9 das 14 amostras avaliadas. A amostra 35 foi a que teve menor consumo, pouco inferior a 50%.

No meio mineral com glicose suplementada com o óleo residual de fritura foram obtidas menores reduções, sendo o maior consumo atingido pela amostra 25, em torno de 88%, e o menor pela amostra 13, em torno de 50%.

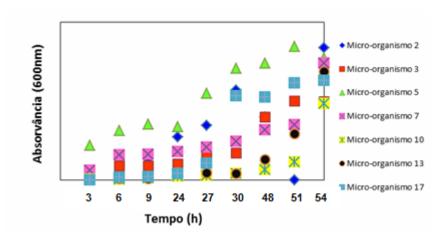
Os 14 sobrenadantes, quando crescidos em meio mineral suplementado com glicose e comparados com o SLS® e o cultivado pela *Yarrowia lipolytica*, apresentaram maior consumo de açúcar. Porém, apesar de se ter maiores taxas de redução de açúcar ocasionado por um maior crescimento celular, seja qual for a fonte de carbono alternativa utilizada, não se pode concluir que a redução de açúcar nesses sobrenadantes implicaram em uma maior produção de biossurfactantes.

O que vai realmente determinar se é um bom produtor são as propriedades físicoquímicas do biossurfactante por ele produzido. Por isso, torna-se necessária a avaliação do meio a partir da tensão superficial e da emulsificação para dizer se o micro-organismo é produtor ou não do bioproduto. Entretanto, vale lembrar que o micro-organismo só produz o biossurfactante ao ser excretado pela célula e, por isso, a sua produção é dependente de densidade populacional.

Assim, uma possível causa para o baixo índice de consumo de substrato pode ser uma concentração inicial de células insuficiente, sendo necessário aumentar a quantidade de micro-organismo inoculado para atingir um melhor crescimento microbiano, apesar de todos os micro-organismos, independente da fonte de carbono utilizada durante o estudo, terem um pré-inóculo de medida de absorvância que variavam de 0,02A a 0,06A antes de serem inoculados nos meios para o processo fermentativo.

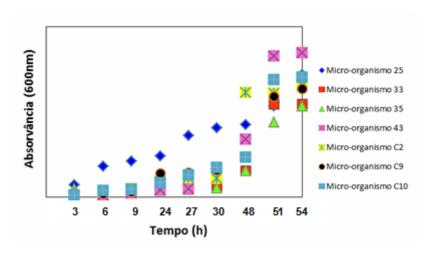
Isto pode ser observado nas Figuras 26 e 27, que ilustram a cinética de crescimento celular ao longo do processo fermentativo dos 14 micro-organismos avaliados, em meio suplementado com glicose 2%.

Figura 26-Cinética de crescimento celular das amostras 2, 3, 5, 7, 10, 13 e 17, tendo a glicose como substrato.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Figura 27-Cinética de crescimento celular das amostras 25, 33, 35, 43, C2, C9 e C10, tendo a glicose como substrato.



Observou-se, então, que muitos dos micro-organismos tiveram uma fase de adaptação mais extensa, iniciando a fase exponencial no 2º dia de fermentação. Portanto, possivelmente ao longo de três dias já se teve o biossurfactante como metabólito produzido.

Através da curva de peso seco e da leitura de absorvância das amostras, obteve-se a concentração celular dos 14 micro-organismos ao final do processo fermentativo, apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 -Concentração celular ao final do processo fermentativo, em meio mineral suplementado com glicose.

| Micro-organismos | Concentração celular (g/L) |
|------------------|----------------------------|
| 2 | 2,42 |
| 3 | 7,99 |
| 5 | 1,76 |
| 7 | 0,89 |
| 10 | 4,65 |
| 13 | 0,63 |
| 17 | 2,19 |
| 25 | 2,75 |
| 33 | 4,37 |
| 35 | 5,92 |
| 43 | 3,99 |
| C2 | 7,09 |
| C9 | 1,12 |
| C10 | 1,21 |

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Ao associar a Tabela 6 com a Figura 25, percebeu-se que a alta concentração celular, a exemplo dos micro-organismos 33 e 35, não corresponderam necessariamente ao alto consumo de glicose, demonstrando crescimento acelerado antes que a fonte de carbono se esgotasse. Isto se correlaciona fortemente com a Figura 27, onde é visualizado o início da fase exponencial após 30 horas de processo, com taxa de crescimento elevada e estabilidade após 6 horas.

A identificação do tempo necessário para o início ou o término de produção dos biossurfactantes, tanto na fase exponencial como na estacionária, bem como a possível degradação parcial desses metabólitos em tempos de cultivo mais prolongados, devem ser melhores investigados.

A Tabela 6 sugere, também, que os micro-organismos 3 e C2 sejam indicativos de produzirem biotensoativos em grandes quantidades, por conta da elevada densidade populacional. Entretanto, como dito anteriormente, análises de tensão superficial e índice de emulsificação devem ser realizadas para revelarem em que proporção esses biossurfactantes serão produzidos, visto que o teste da biodegradabilidade demonstrou que esses micro-organismos são produtores de sabões biológicos.

5.4.1.2 Vinhaça

A Figura 28 mostra o consumo dos monossacarídeos nos 14 sobrenadantes avaliados, provenientes do crescimento microbiano em meio mineral suplementado com vinhaça, óleo + vinhaça e vinhaça +manipueira, ao final do processo fermentativo.

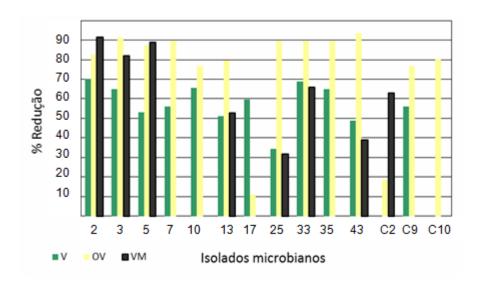


Figura 28-Percentual da redução de AR nos meios de vinhaça, vinhaça + óleo e vinhaça + manipueira.

Pode-se notar que a maioria dos sobrenadantes em meio mineral com vinhaça suplementado com óleo como fonte de carbono consumiram quase que a sua totalidade inicial ao final do processo fermentativo. Entretanto, quando provenientes do crescimento do meio apenas com a vinhaça, não se conseguiu percentuais superiores a 70% no consumo de açúcares. Quando oriundos da vinhaça suplementada com manipueira, os sobrenadantes provenientes dos micro-organismos 2, 3, 5 e C2 consumiram quantidade aceitável de açúcares redutores, apresentando comportamento praticamente equivalente ao meio mineral com óleo e vinhaça.

5.4.1.3 Manipueira

A Figura 29 mostra o consumo dos monossacarídeos nos 14 sobrenadantes avaliados, provenientes do crescimento microbiano em meio mineral suplementado com óleo + manipueira e vinhaça +manipueira, ao final do processo fermentativo.

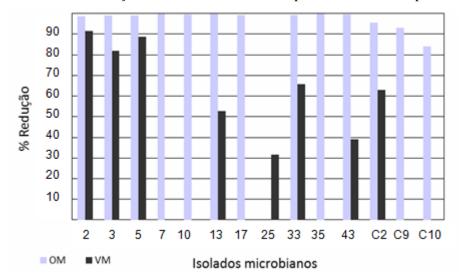


Figura 29-Percentual da redução de AR nos meios de manipueira + óleo e manipueira + vinhaça.

Por ser um produto rico em amido, o meio mineral com manipueira não apresentou concentração em açúcar redutor, pois há a necessidade de o amido ser transformado por hidrólise química ou enzimática em açúcar para que a fermentação ocorra.

Apesar dos micro-organismos produzirem constituintes que quebrem as ligações glicosídicas presentes no amido durante o crescimento celular, foi possível verificar concentrações de açúcar redutor. Contudo, os isolados provenientes do meio suplementado com manipueira não constam no gráfico por não haver como comparar a quantidade inicial de açúcar contida no meio mineral com tal fonte de carbono antes de qualquer inoculação microbiana.

Os micro-organismos crescidos em meio de manipueira suplementado com óleo tiveram consumo de açúcar superior a 80% ao final da fermentação. Ao comparar a quantidade inicial de açúcar em relação ao meio mineral com manipueira suplementado com vinhaça, observa-se que as amostras 2, 3 e 5 apresentaram um bom crescimento celular, por conta da quantidade de AR encontrada nos respectivos sobrenadante com biossurfactantes.

Avaliando as três fontes de energia estudadas neste trabalho, percebe-se que todos os sobrenadantes produzidos em meios suplementados com óleo resultaram em maior consumo de açúcares do que os que não tiveram tal componente na suplementação dos meios minerais.

Segundo Makkar e Cameotra (1998), ao longo de vários estudos que envolveram a

utilização de diferentes substratos como fontes alternativas de carbono na produção de biossurfactantes, os óleos podem atuar como indutores, influenciando no tipo e no rendimento do biossurfactante.

Os óleos residuais de fritura, no processo fermentativo, podem ser hidrolisados por lípases provenientes de algumas espécies microbianas formando ácidos graxos, nos quais podem sofrer degradação para obter energia para o crescimento celular ou para serem transformados em precursores lipídicos, promovendo a biossíntese de biossurfactantes (LANG; WULLBRANDT, 1999). Além disso, um dos papéis dos biotensoativos é auxiliar o crescimento dos micro-organismos em meios hidrofóbicos, reduzindo a tensão superficial do meio e fazendo com que esses meios sejam mais facilmente disponíveis (FIECHTER, 1992).

5.4.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares redutores totais (ART) ou não redutores, diferentemente dos monossacarídeos (AR), precisam sofrer uma ação enzimática ou ácida para a quebra da ligação glicosídica e liberar grupos aldeídicos e cetônicos, pois em soluções aquosas permaneceriam estáveis.

A Figura 30 correlaciona as amostras de biossurfactantes produzidos pelos microorganismos crescidos nas sete formulações de meios contendo fontes alternativas de carbono em relação à quantidade final de açúcares redutores totais (ART) ao final do processo fermentativo.

Observaram-se percentuais de redução de ART maiores que 80% nos diferentes meios, com exceção dos produzidos a partir dos micro-organismos fermentados em meio mineral com vinhaça + manipueira.

França et al. (2010), em estudos de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005, verificaram uma concentração final de aproximadamente 0,3 g/L ao usarem meio contendo açucares redutores totais (glicose e frutose) na concentração inicial de 30,07 g/L como fonte de carbono.

Em estudos realizados por BUENO et al. (2002) foram observados que altos valores de açúcares redutores totais indicam que a molécula do biopolímero tem alto peso molecular.

90 80 70 G 60 % Remoção OG 50 V 40 OV 30 ■ M 20 ■ VM 10 2 3 5 7 10 13 17 25 33 35 43 C2 C9 C10 Isolados microbianos

Figura 30-Percentual da redução de ART em diferentes fontes alternativas suplementadas ao meio mineral.

Na literatura há uma variedade ampla de fontes de carbono utilizadas para a produção de substâncias biotensoativas. Pareilleux et al. (1979) isolaram compostos tensoativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo n-alcanos como fonte de carbono, mas quando cultivada em meio contendo glicose, a levedura não apresentou resultados positivos. Em estudos similares, Kim & Rehm (1982) e Cirigliano & Carmam (1984) mostraram que a levedura *Yarrowia lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, de oliva, de milho e de algodão, sendo que na presença do hexadecano houve maior produção de biossurfactante.

5.4.3 Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

A Tabela 7 mostra o teor de sólidos solúveis dos sobrenadantes livres de células ao final do processo fermentativo com os 14 micro-organismos avaliados, nas diferentes fontes de carbono alternativas utilizadas no estudo, em comparação com a levedura *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682).

Nos experimentos com glicose, a suplementação do óleo resultou em aumento significativo no teor de sólidos solúveis. Entretanto, ao avaliar a quantidade residual de sólidos em relação a uma levedura conhecida na literatura por seu potencial produtor de biossurfactante, a *Yarrowia lipolytica*, observou-se que apenas a cultura 25 possuiu um

consumo semelhante dos açúcares.

Tabela 7 - Teor de sólidos solúveis em caldos fermentados suplementados com diferentes fontes de carbono.

| Amostras | G | OG | M | OM | V | ov | VM |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 2 | 3,3 | 4,4 | 1,2 | 1,2 | 3,6 | 5,1 | 2,9 |
| 3 | 2,4 | 5,3 | 1,3 | 0,8 | 3,8 | 4,5 | 3,5 |
| 5 | 2,5 | 6 | 1,7 | 1,4 | 4,8 | 4,6 | 3,3 |
| 7 | 2,9 | NR | 2,9 | 2,1 | 4,8 | 3 | NR |
| 10 | 3 | NR | 1,3 | 0,9 | NR | NR | 3,4 |
| 13 | 2,9 | NR | 0,6 | 1,3 | 4,8 | 5,2 | NR |
| 17 | 3,2 | 5,4 | 1 | 1 | 5,3 | 4,7 | 3,7 |
| 25 | 1,5 | NR | 1 | 2 | 4,5 | 2,8 | 4,3 |
| 33 | 2,7 | 4,2 | 0,6 | 1,2 | 4,5 | 3,2 | NR |
| 35 | 2,9 | 6,3 | 0,8 | 1,8 | 4,5 | NR | 3,9 |
| 43 | 3,1 | 6,3 | 1,4 | 0,8 | 4,5 | 3 | 4,6 |
| C2 | 3 | 6,7 | 0,9 | 1,1 | NR | 7,2 | NR |
| C9 | 2,6 | 6,1 | 0,3 | 1,1 | 5,9 | NR | NR |
| C10 | 2,9 | 6,2 | NR | 1,2 | NR | 6,4 | NR |
| YL | 1,7 | | | | | | |

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

NR =não realizada

Tendo manipueira como fonte principal de carbono, verificaram-se menores concentrações residuais e, também, que a suplementação com óleo residual, em alguns casos, aumentou o consumo de açúcares.

Ao se utilizar a vinhaça como principal fonte energética, maiores resíduos em sólidos solúveis foram observados. Quando suplementada, a vinhaça obteve melhor comportamento na presença de manipueira em comparação ao óleo de fritura.

5.4.4 Determinação da concentração de proteínas nos biossurfactantes

A Figura 31 ilustra as produções de proteína alcançadas ao fim do processo fermentativo para cada cultura microbiana, nas diferentes fontes de carbono estudadas. A legenda de 1 a 14 representa as 14 amostras de sobrenadantes (2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 25, 33, 35, 43, C2, C9 e C10), além da determinação de proteínas no SLS® e da proveniente da *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682).

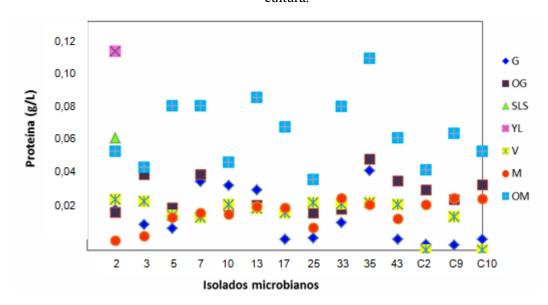


Figura 31-Concentração de proteína ao final do processo fermentativo, em diferentes meios de cultura.

A Yarrowia lipolytica 583 (IMUFRJ 50682) superou a produção de proteína até mesmo do surfactante sintético. Tais resultados corroboram Tsugawa et al. (1969), que citam que a levedura é bastante utilizada em aplicações industriais justamente pela produção de proteínas.

Observaram-se, nas fontes alternativas avaliadas, baixas quantidades de proteína quando comparadas com o SLS[®] e o produzido pela *Yarrowia lipolytica*. Todavia, quando suplementadas pelo óleo, foram obtidas concentrações expressivas, em especial com a manipueira, demonstrando que nestas condições o micro-organismo teve seu desenvolvimento celular favorecido. As culturas 5, 7, 13, 33 e 35 tiveram incremento protéico com a suplementação da manipueira pelo óleo residual acima de 70%, superando a concentração de proteína do surfactante sintético. A amostra 35 chegou a níveis de proteína equivalentes ao obtido pela *Yarrowia*.

Segundo Amaral (2007), a interação entre as células e compostos hidrofóbicos parece ser mediada por proteínas ou glicoproteínas da parede celular, favorecendo esta produção.

5.4.5 Determinação da tensão superficial

Sabendo que as possíveis aplicações dos biossurfactantes são determinadas pelas

características físico-químicas dos mesmos, um bom e eficaz produto deve reduzir a tensão superficial da água destilada, que é de aproximadamente 70 mN/m à temperatura ambiente, para 40 mN/m ou menos (COOPER et al., 1979).

A Tabela 8 mostra os valores de tensão superficial ao final do crescimento dos 14 isolados microbianos, nos diferentes meios de crescimento avaliados, após os testes da biodegradabilidade e do colapso da gota considerarem estes micro-organismos como produtores de biossurfactantes. Os resultados são apresentados pela média e desvio padrão da análise realizada em triplicata.

Tabela 8-Tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes obtidos após o crescimentos dos isolados em diferentes fontes de carbono após sete dias à 30°C e 110rpm.

| Amostras | G | OG | M | OM | V | ov | VM |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2 | 47,90±0,18 ^e | 32,74±0,03 ^{ef} | 49,97±0,20° | 35,30±0,12 ^{bc} | 42,39±0,06 ^b | 34,69±0,20 ^{ef} | 31,46±0,13 ^e |
| 3 | 55,06±0,37 ^a | 35,90±0,12° | 44,77±0,11 ^e | $36,49\pm0,07^{ab}$ | 43,39±0,09 ^a | $36,84\pm0,46^{c}$ | $40,11\pm0,11^d$ |
| 5 | $48,12\pm0,70^{de}$ | $33,61\pm0,11^{d}$ | 46,85±0,91 ^d | $36,78\pm0,09^{ab}$ | 43,38±0,16 ^a | $34,84\pm0,05^{ef}$ | $42,27\pm0,24^{b}$ |
| 7 | 50,02±0,45° | 44,16±0,05° | $53,77\pm0,05^{ab}$ | $34,63\pm0,15^{c}$ | 41,32±0,04 ^e | 34,45±0,03 ^f | NR |
| 10 | 49,21±0,44 ^{cd} | NR | 46,90±0,23 ^d | $32,23\pm0,05^{d}$ | 40,37±0,06 ^f | NR | NR |
| 13 | 44,87±0,13 ^g | 32,76±0,11 ^e | 32,70±0,60 ^h | $29,30\pm0,01^{d}$ | 41,47±0,08 ^{de} | $36,05\pm0,42^{d}$ | 43,18±0,11 ^a |
| 17 | 44,91±0,14 ^g | $36,96\pm0,06^{b}$ | 40,87±0,99 ^g | 29,30±0,03 ^{fg} | 40,23±0,24 ^f | $34,54\pm0,36^{ef}$ | NR |
| 25 | 46,32±0,07 ^f | 32,24±0,13 ^{fg} | 49,97±0,08° | 37,95±0,20°a | 43,11±0,17 ^a | $35,94\pm0,03^{d}$ | 42,92±0,19 ^{ab} |
| 33 | 47,87±0,32 ^e | 36,14±0,24° | 52,22±0,09 ^b | 34,89±0,12° | $32,92\pm0,29^{g}$ | 39,85±0,05 ^a | 42,31±0,17 ^b |
| 35 | 51,20±0,54 ^b | 35,96±0,10° | 40,86±0,21 ^g | $30,43\pm0,12^{ef}$ | 42,17±0,15 ^{bc} | NR | NR |
| 43 | $40,71\pm0,09^{h}$ | 31,84±0,13 ^g | 42,54±0,27 ^f | 31,08±1,91 ^{de} | 42,50±0,11 ^b | 35,16±0,09 ^e | 41,81±0,30 ^{bc} |
| C2 | 43,92±0,47 ^g | 33,08±0,41 ^e | 50,55±0,90° | $30,92\pm0,27^{de}$ | NR | 32,76±0,07 ^g | 40,59±0,35 ^{cd} |
| C9 | 38,68±0,15 ⁱ | NR | 45,85±0,88 ^{de} | $28,45\pm0,016^{g}$ | 41,29±0,14 ^e | NR | NR |
| C10 | 38,74±0,03 ⁱ | NR | 54,10±0,27 ^a | 37,85±0,09 ^a | 41,84±0,11 ^{cd} | $37,81\pm0,06^{b}$ | NR |
| YL | 57,05±0,27 | | | | | | |

As letras a, b, c, d, e, f, g, h, i significam que as amostras foram significativamente diferentes (p < 0.05); $NR = n\tilde{a}o$ realizada

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

As diferentes formulações dos meios minerais, suplementadas com as fontes diferenciadas de carbono ofertadas pela vinhaça, manipueira, óleo residual de fritura e glicose, conseguiram reduzir a tensão superficial da água destilada, 70,94 mN/m, e, principalmente,

reduziram a tensão superficial quando comparados com o controle positivo, SLS[®] 1%, o qual teve um valor de 40 mN/m, e da *Yarrowia lipolytica* crescida em glicose, que resultou em 57,05 mN/m.

Tais resultados confirmam que os 14 sobrenadantes possuem a presença de compostos com a propriedade tensoativa de biossurfactantes, ressaltando ainda que esses valores poderiam sofrer uma maior redução das tensões superficiais se os efluentes obtidos tivessem sido isolados e purificados.

Verificou-se que na maioria dos isolados crescidos em óleo, como nas amostras 3, 5 e 25 em presença de óleo e glicose (OG), na amostra 7 em formulação com óleo e vinhaça (OV) e, especialmente, nos sobrenadantes 10, 13, 17, 35, 43, C2 e C9 em presença de óleo e manipueira (OM), foram obtidas maiores reduções de tensão superficial, alcançando resultados satisfatórios para a produção de surfactante com características desejáveis a aplicações ambientais.

Para a manipueira, esses resultados podem ser atribuídos à presença de minerais e açúcares no substrato, em proporções adequadas à produção de biossurfactantes. Nitrogênio e manganês, por exemplo, considerados fatores importantes na produção desse bioproduto por vários micro-organismos, estão presentes nessa formulação.

Em um estudo realizado por BARROS et al. (2008), mostrou-se que o biossurfactante testado, tendo a manipueira como substrato, exibiu uma considerável atividade tensoativa, reduzindo a tensão da água de 72,31 mN/m para 27,01 mN/m. Trabalhos semelhantes são reportados por Cooper , Zajic e Gerson (1979), Peypoux, Bonmartin e Wallach (1999) e Nitschke e Pastore (2006), considerando a manipueira como um potencial substrato para o uso em processo de produção de surfactante, a exemplo do gênero de bactéria *Bacillus*.

Nas formulações com vinhaça, observaram-se excelentes atividades tensoativas com o substrato puro (V) na amostra 33, na mistura com a manipueira (VM) para a amostra 2, e na amostra C10 em formulação com o óleo residual de fritura.

As diferenças entre padrões de resposta das mesmas espécies em meio mineral base com diferentes fontes de carbono refletem diferenças nas exigências nutricionais para a produção de biossurfactantes, com destaque para o suprimento de nitrogênio, ferro, manganês e, principalmente, carbono elementos cuja concentração alteram significativamente a

produção de biossurfactantes pelos micro-organismos em estudo (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998; 2002; ABOUSEOUD et al., 2008).

Na Tabela 8 foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação às reduções das tensões superficiais de acordo com a fonte de carbono, utilizando o programa ASSISTAT, Assistência Estatística, Versão 7.6 beta (SILVA, 2006).

Verificou-se, pela análise estatística, que no meio mineral suplementado com glicose os biossurfactantes 2, 5 e 33, 5 e 10, 7 e 10, 13, 17 e C2 e os biossurfactantes C9 e C10 não diferem estatisticamente entre si. Porém, os biossurfactantes 3, 25 e 43, produzidos a partir dessa fonte de carbono, apresentaram reduções da tensão superficial da água de modo peculiar, não se comparando estatisticamente com os demais biossurfactantes.

Quando a mesma fonte de carbono é suplementada com oléo residual de fritura, os biossurfactantes 2, 5 e 33 diferem estatisticamente entre si e do grupo 13, 17 e C2. Apenas os biossurfactantes 13 e C2 continuam a não terem valores de tensão sem diferença significativa, além dos biossurfactantes 2, 13 e C2, 3, 33 e 35 e das amostras 25 e 43. A amostra 25, tendo o óleo de fritura como fonte de carbono juntamente com a glicose, comportou-se de modo diferenciado quando comparada às demais.

Em relação aos bioprodutos obtidos a partir do processo fermentativo, utilizando o resíduo da vinhaça como suplementação do meio mineral, apenas o micro-organismo 33 diferiu estatisticamente das demais amostras, continuando com esse comportamento quando o meio tem adição do óleo de fritura. Todavia, quando a suplementação passa a ser a manipueira a amostra 33 passa a não diferir estatisticamente, juntamente com 5, 25 e 43.

No grupo dos biossurfactantes produzidos com óleo e manipueira, foram observadas as maiores reduções da tensão superficial. De um modo geral, não foi verificada diferença significativa entra as amostras (10, 13, 43 e C2, 3, 5, 25 e C10, 2, 3 e 5, 2, 7 e 33, 35, 43 e C2, 17 e 35 e os bioprodutos 17 e C9), indicando que esta suplementação ao meio mineral possui todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano para a produção de metabólicos biotensoativos. Isso ocorreu porque, nas demais fontes, ao menos um tipo de biossurfactante exigiu outra fonte suplementar de nutriente que aquela oferecida, como, por exemplo, os biossurfactantes 25 e 43, 5, 10, C10, 13 e 2, nas respectivas fontes, glicose, óleo + glicose, vinhaça, óleo + vinhaça, manipueira e vinhaça + manipueira.

5.4.6 Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da estabilidade das emulsões, só foram utilizados os sobrenadantes, livre de células, provenientes dos micro-organismos 2, 3, 5, 7, 13, 17, 33 e 35, além do SLS[®], empregado como controle positivo no experimento.

É importante ressaltar que emulsões recém-preparadas não devem ser submetidas de imediato a testes de estabilidade, pois durante seu desenvolvimento pode não ter havido a oportunidade de equilíbrio pleno. Isto pode ser explicado quando se considera a instabilidade intrínseca das emulsões, ou seja, a dispersão pode não ter adquirido estabilidade logo após o preparo. Assim, é desejável um período inicial de espera para que haja a estabilização, sendo usualmente aceito um período entre 24 a 48 horas após o preparo (DI MAMBRO, 2001; MASSON, 2005).

Como ilustrado nas Figuras 32 e 33, os biossurfactantes produzidos pelos isolados 2, 3, 5, 7, 13, 17, 33 e 35 foram capazes de formar emulsões estáveis com querosene e/ou hexano, ao longo de 48 horas. Essa também é uma característica específica de moléculas que possuem caráter anfifílico (ILORI AMOBI e ODOCHA, 2005). Todos os biossurfactantes formaram emulsões consideradas estáveis, uma vez que seus volumes, 24 horas após a formação, ainda correspondiam a 50% ou mais do seu volume original (WILLUMSEN; KARLSON, 1997).

Observa-se na Figura 32 que, à exceção do sobrenadante 2, todas as amostras apresentaram-se estáveis na formação da emulsão em presença do querosene nas primeiras 24 horas. Para a emulsificação em presença de hexano (Figura 33), contudo, apenas as amostras 2 e 3 mantiveram a estabilidade nas primeiras 24 horas.

Curiosamente, de acordo com a Figura 33, na maioria dos tratamentos houve uma queda acentuada do volume das emulsões até 24 horas após a mistura, ocorrendo uma estabilização após esse período.

Os biossurfactantes gerados nesta pesquisa não apresentaram maior estabilidade de emulsão do que o surfactante sintético, SLS[®], quando da utilização de querosene como substrato, pois o SLS[®] estabilizou 60,4% da emulsão após 48 horas (Figura 32), enquanto a maioria produzida no estudo não foi superior a 22%.

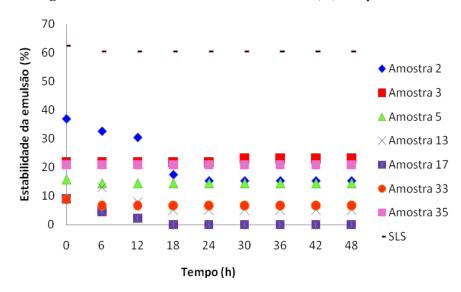


Figura 32 - Gráfico da estabilidade da emulsão (%) em querosene.

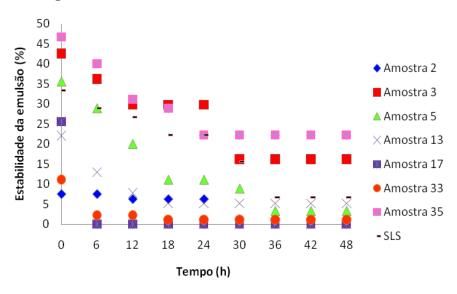


Figura 33-Gráfico da estabilidade da emulsão (%) em hexano.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Porém, quando o substrato foi o hexano, os biossurfactantes 3 e 35 apresentaram maior ou igual estabilidade de emulsão em relação ao SLS® (29,8% e 22,2%, respectivamente) ao final das 24 horas, indicando a habilidade dos mesmos em emulsificar misturas de hexano. Isto sugere que os biossurfactantes em estudo atuam com alta eficiência quando o substrato de hidrocarbonetos é composto por misturas de componentes alifáticos e aromáticos, como o hexano. Tal fato também foi comprovado por Rosemberg et al. (1979) ao

avaliarem a emulsificação de misturas de substratos oleosos pelo emulsificante de *Arthrobacter* RAG-1.

Os biossurfactantes produzidos pelos isolados 3, 5, 7, 13, 17 e 33 exibiram uma alta atividade emulsificante, formando emulsões consideradas estáveis com o querosene. As culturas 3 e 35 geraram índices de emulsificação superiores ao SLS® ao se empregar o hexano como substrato (Figura 33).

Os dados obtidos podem ser utilizados para dar continuidade aos estudos de quantificação e caracterização físico-química (concentração micelar crítica, diluição micelar crítica, estabilidade em pH, temperatura e concentrações salinas variáveis, etc.) dos biossurfactantes produzidos pelos isolados, visando a otimização dos processos de produção e possíveis aplicações desses compostos.

Também, mostram-se relevantes para várias aplicações dos biossurfactantes, visto que a capacidade de emulsificação é importante na solubilização de compostos hidrofóbicos em processos de biorremediação (MIHELCIC et al., 1993; VOLKERING et al., 1995), na recuperação avançada de petróleo (BANAT, 1995), na remoção do óleo retido em borras oleosas (BANAT et al., 1991), entre outros.

A estabilidade de uma emulsão pode ser afetada por diversos fatores, em especial os ambientais, como a salinidade (ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005). Porém, todas as instabilidades conduzem aos mesmos fenômenos: quebra da emulsão ou inversão de fases (ROSEN, 2004). A preservação da estabilidade sob condições adversas é um importante atributo para os surfactantes, pois a maioria das áreas de aplicações de surfactantes requer um comportamento constante.

O efeito da adição de NaCl, em concentrações de 0,5, 2,5, 5,0 e 15%, nos substratos de querosene e hexano, sob a estabilidade de emulsão dos biossurfactantes produzidos pelos isolados 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 33 e 35 foi avaliado, como mostra a Tabela 9. Os resultados obtidos são apresentados pela média e desvio padrão das 3 repetições efetuadas.

Todavia, por não se avaliar todas as condições de salinidade, temperatura e pH desse tipo de tratamento, não é possível identificar os principais fatores que afetam a qualidade e o rendimento do biossurfactante, pois devido aos poucos resultados não se tem como montar uma estratégia de valores ótimos, buscando a reprodutibilidade na qualidade do

biossurfactante produzido.

Tabela 9-Atividade de emulsificação de querosene e hexano (%) em diferentes concentrações salinas com alguns biossurfactantes obtidos no estudo e com SLS[®], no início e ao final de 24 horas de contato.

| Amostras | Querosene [0,5%] | | • | Querosene [2,5%] | | Querosene [5,0%] | | Hexano [15%] | |
|--------------------------|---------------------|---------------|------------|---------------------|---------------|---------------------|------------|-----------------|--|
| Amostras | 0h | 24h | 0h | 24h | 0h | 24h | 0h | 24h | |
| 2 | 12,77±0,1 | 3,19±0,05 | 15,91±0,06 | 5,68±0,10 | 7,0±0,08 | - | 25,53±0,17 | 12,77±0,00 | |
| 3 | 2,98±0,06 | 2,98±0,06 | 19,57±0,00 | 19,57±0,0 | - | - | 34,02±0,3 | 15,91±0,15 | |
| 5 | 19,57±0,0 | - | - | - | 8,51±0,06 | 2,13±0,03 | 24,49±0,17 | $6,12\pm0,1$ | |
| 7 | - | - | - | - | - | - | 26,19±0,06 | $8,09\pm0,06$ | |
| 10 | - | - | - | - | - | - | 33,33±0,00 | $13,89\pm0,15$ | |
| 13 | 18,37±0,00 | 12,24±0,00 | 16,67±0,06 | 10,42±0,15 | 6,12±0,00 | 2,04±0,06 | 16,18±0,11 | $0\pm0,0$ | |
| 17 | 11,36±0,06 | - | 8,89±0,06 | - | 16,33±0,06 | - | - | - | |
| 33 | $6,67\pm0,00$ | $1,11\pm0,00$ | 10,64±0,06 | $1,06\pm0,03$ | $7,14\pm0,08$ | - | - | - | |
| 35 | 16,67±0,06 | $14,29\pm0,1$ | 10,87±0,12 | 10,87±0,12 | 6,52±0,09 | 6,52±0,09 | - | - | |
| $SLS^{\tiny{\circledR}}$ | 14,89±0,15 | 6,38±0,00 | - | - | - | - | - | - | |

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Verificou-se que em querosene, até as primeiras 24 horas, os biossurfactantes 3, 13 e 35 são praticamente estáveis até a concentração salina de 2,5%, sendo que o biossurfactante 35 consegue manter a estabilidade até 5,0% de sal. Em hexano, observou-se que os biossurfactantes 2 e 3 conseguem manter cerca de 50% de sua estabilidade na emulsão após 24 horas quando em concentrações salinas de 15%.

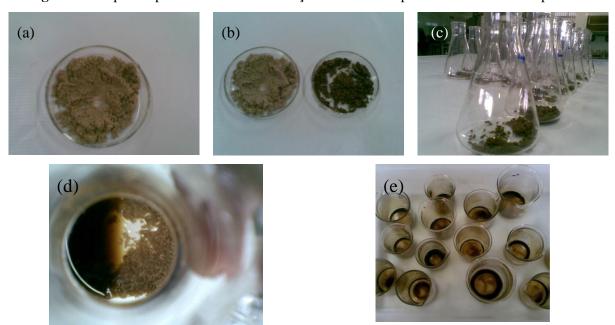
Uma emulsão instável pode ser eventualmente destruída, levando a separação completa das duas fases. Nesse caso, não há estabilização no caso de emulsão do tipo águaóleo (A/O) com uma concentração salina relativamente alta (>5,0%). Para entender esta observação, podemos considerar as mudanças das características na emulsão A/O como resultado da adição de sal (NaCl). Pela teoria de difusão do íon, um mesmo conteúdo de água, quando a concentração de sal aumenta, a energia interna do sistema também aumenta (MOHAMED; EL GAMAL; ZEKRI, 2003). Consequentemente, as emulsões não são estáveis termodinamicamente e as gotas de água fundem-se umas com as outras para produzir gotas maiores e aumentar a taxa de coalescência. Coalescência é um dos possíveis mecanismos de destruição de emulsões, a qual ocorre quando a energia de adesão entre duas gotas é maior que a energia de turbulência que causa a dispersão (BIBETTE; CALDERON; POULIN, 1999).

Este resultado é importante quando se considera o uso de biossurfactante na biorremediação em ambientes salinos, como por exemplo, na recuperação de derramamentos de petróleo em ambientes marinhos. Alguns biossurfactantes analisados suportaram concentrações de 5,0% de NaCl em querosene, apesar de não manter toda sua estabilidade, e quando em hexano, suportaram até 15%, enquanto que concentrações salinas 2 a 3% são suficientes para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

5.5 Potencial para biorremediação

A Figura 34 esquematiza o processo de contaminação da areia de praia com o óleo cru até remoção do petróleo pelas 14 amostras de biossurfactantes, na concentração 1,5% (v/v) das sete diferentes composições do meio mineral. A areia da praia (a) foi contaminada pelo óleo (b) e distribuída em erlenmeyers (c), que receberam as amostras de biossurfactante, mantendo um contato de 24h em *shaker* a 24°C e 110rpm (d). Após esse período, obtém-se o óleo recuperado pela biorremediação (e).

Figura 34-Etapas do processo de biorremediação com areia de praia contaminada com petróleo.



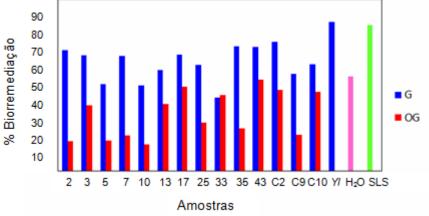
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A vantagem de se ter neste estudo várias amostras microbianas, por mais que não se tenha a identificação das espécies, é vantajoso, pois permite uma varredura nas características que mais se enquadram na técnica de biorremediação. Segundo Crapez et al. (2002),

Tiburtius, Peralta-Zamora e Leal (2004) e Jacques et al. (2007), a biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum micro-organismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com micro-organismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo.

Os resultados do potencial para avaliar a capacidade das 14 amostras de biossurfactantes na biorremediação do petróleo, nos sete meios: glicose, vinhaça, manipueira, óleo + glicose, óleo + vinhaça, óleo + manipueira e vinhaça + manipueira, além água, SLS[®] e *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) são mostrados nas Figuras 35 a 37.

Figura 35-Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes e SLS® na concentração de 1,5% (v/v) em meios de glicose e óleo + glicose.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Nos ensaios formulados com glicose 2%, observou-se que alguns isolados microbianos (2, 3, 7, 17, 35, 43 e C2) têm capacidade acima de 60% em reduzir a contaminação pelo petróleo. Porém, nenhum biossurfactante superou a biorremediação conduzida pela *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), de 78%, no qual o biossurfactante produzido foi capaz de superar o potencial de biorremediação do SLS[®], que foi de 76%. A suplementação com óleo residual não auxilia o processo, sendo mais ineficiente que a água.

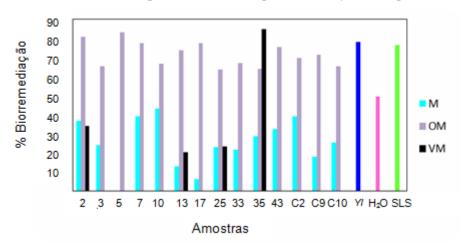
Amostras

Figura 36-Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes e SLS[®] na concentração de 1,5% (v/v) em meios de vinhaça, óleo + vinhaça e vinhaça + manipueira.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Os meios formulados em presença de vinhaça não geraram resultados satisfatórios. A exceção foram os isolados 35, suplementado com manipueira, que gerou um potencial de recuperar 85% do óleo cru da areia de praia contaminada com petróleo, maior do que o da *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) e do SLS[®], e C2, suplementado com óleo residual de fritura, com capacidade de biorremediação em torno de 65%.

Figura 37-Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes e SLS[®] na concentração de 1,5% (v/v) em meios de manipueira, óleo + manipueira, vinhaça + manipueira.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Os resultados de biorremediação em meio com manipueira suplementado com óleo de fritura foram relevantes, comprovando mais uma vez a eficiência da suplementação como fonte de carbono alternativa para a produção de biossurfactantes. Nesta condição, o potencial

dos biossurfactantes foram maiores do que quando os mesmos foram provenientes de qualquer outra formulação do meio mineral, chegando a recuperarem o petróleo acima de 60%.

Neste estudo, não se tem a identificação das espécies bactérias e leveduras com potenciais tensoativos. Porém, desde a década de 50, bactérias degradadoras de petróleo vêm sendo isoladas e estudadas e dentre os principais gêneros envolvidos no processo de biorremediação estão: Acidovorans, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Aeromonas, Arthrobacter, Beijemickia, Burkholderia, Bacillus, Comomonas, Corynebacterium, Cycloclasticus, Flavobacterium, Gordonia, Microbacterium, Moraxella, Mycobacterium, Micrococcus, Neptunomonas, Nocardia. Paracoccus, Pasteurella, Polaromonas, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Sphingomonas, Stenotrophomonas, Streptomyce e Vibrio (CRAPEZ et al. 2002; JACQUES et al., 2007; MANDRI & LIN, 2007; SEO, KEYN; LI, 2009), nos quais as bactérias do estudo tem grandes chances de pertencerem.

A aplicabilidade dos micro-organismos em estudo no processo de biorremediação do óleo cru foi constada, sendo sua eficiência validada quando comparado ao SLS[®] e a *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), um micro-organismo identificado na literatura como competente produtor de biossurfactante.

5.6 Desempenho dos biossurfactantes de acordo com o tipo de micro-organismo

Constatado a produção de biossurfactante mais eficiente quando se utiliza como fonte de carbono o resíduo agroindustrial manipueira suplementado com óleo residual de fritura, a Tabela 10 mostra os onze biossurfactantes produzidos quando comparados ao produzido pela *Yarrowia lipolytica* e ao SLS® frente aos potencias de biorremediação e a redução de tensão superficial, sem desvio padrão, para que se identifique o desempenho dos biossurfactantes produzidos em relação ao tipo de micro-organismo.

Tabela 10-Desempenho dos biossurfactantes em relação ao tipo de micro-organismo em meio suplementado com óleo de fritura e manipueira.

| Amostras de biossurfactantes | Tipo de micro- organismo | Coloração de Gram | Potencial de biorremediação (%) | Tensão superficial (mN/m) |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 2 | levedura | | 80,66 | 35,30 |
| 3 | levedura | | 65,37 | 36,49 |
| 5 | levedura | | 83,07 | 36,78 |
| 7 | bactéria | - | 77,51 | 34,63 |
| 10 | bactéria | + | 66,51 | 32,23 |
| 13 | bactéria | + | 73,82 | 29,30 |
| 17 | levedura | | 77,37 | 29,30 |
| 25 | bactéria | - | 63,79 | 37,95 |
| 33 | bactéria | - | 66,94 | 34,89 |
| 35 | bactéria | - | 63,82 | 30,43 |
| 43 | bactéria | + | 75,54 | 31,08 |
| C2 | bactéria | - | 69,61 | 30,92 |
| C9 | bactéria | + | 71,30 | 28,45 |
| C10 | bactéria | + | 65,25 | 37,85 |
| YL | levedura | | 78,12 | 57,05 |
| SLS® | - | - | 76,38 | 40,0 |

Na Tabela 10, os biossurfactantes 2, 3, 5, 17 produzidos a partir de leveduras apresentaram potenciais de biorremediação superiores a 70% e ao da *Yarrowia lipolytica*, com exceção do biossurfactante 2 que foi inferior a esse porcentual e com reduções da tensão superficial da água entre valores de 29 a 37 mN/m, sendo estes capazes de reduzir mais eficientemente que a *Yarrowia* e reduções abaixo da tensão obtida pelo surfactante sintético.

Quanto ao biossurfactantes 7, 10, 13, 25, 33, 35, C2, C9 e C10, produzidos por bactérias, foram obtidos potenciais de biorremediação entre 63 e 78%, assim como as medidas de tensão superficial variando entre 29 a 37 mN/m, sendo menos eficientes quando comparados com os biossurfactantes produzidos pela leveduras. Em sua maioria, são bactérias com Gram negativas.

A Tabela 10 corrobora, então, a importância de se re(utilizar) a manipueira e o óleo residual de fritura em processos biotecnológicos visando a produção, principalmente, dos sabões biológicos, pois o biotensoativo produzido pela levedura *Yarrowia lipoltica*, tendo a glicose como substrato, teve resultados inferiores ao das leveduras e bactérias produtoras de biossurfactantes que utilizaram o resíduo de manipueira e óleo de fritura como fonte de carbono para o processo de produção, bem como substrato alternativo para o isolamento dos micro-organismos.

Alcançou-se, portanto, dois focos principais do trabalho, ou seja, o reaproveitamento da biomassa, ressaltanto a importância ambiental, e a produção de biotensoativos, a partir destas fontes alternativas de carbono como suplementação do meio mineral, com propriedades de biorremediação e redução da tensão superficial da água superiores ao surfactante sintético.

Os micro-organismos 2 e 3, caracterizados como leveduras, produziram bioprodutos com maiores potenciais de reduções do petróleo de areia da praia. Os micro-organismos 13, 17 e C9, visualizados como bactérias, geraram bioprodutos com maiores reduções de tensão superficial da água, superiores a *Yarrowia* e ao SLS[®].

5.7 Isolamento dos biossurfactantes

Pela metodologia utilizada no estudo para a extração dos biossurfactantes do caldo de fermentação proveniente do meio mineral suplementado com glicose, apenas os extratos brutos contendo os surfactantes produzidos pelos isolados 7, 25, 43, C2, C9 e C10, obtidos após extração líquido-líquido, puderam ter sido isolados. Os demais não foram isolados por terem características físico-químicas não condizentes com essa metodologia de extração. A Figura 38 ilustra o extrato bruto isolado proveniente do micro-organismo C10. Nas amostras 7, 25, 43, C2 e C9, a quantidade de material foi insuficiente para a visualização, uma vez que se partiu de 10 mL do sobrenadante livre de células.



Figura 38-Extrato bruto obtido do biossurfactante C10.

5.8 Análises por componentes principais (ACP)

Os resultados obtidos na avaliação dos biossurfactantes compõem um conjunto de dados de características multivariadas, nas quais inclui concentração de açúcares, concentração de proteína, estabilidade das emulsões, atividade de emulsificação frente a diferentes concentrações salinas, potencial de biorremediação e produção dos biossurfactantes em fontes diferenciadas de carbono pra a suplementação do meio mineral.

Para facilitar a visualização e a interpretação desses resultados frente a estas variáveis, devido a essa grande quantidade de informação, foi aplicada a técnica multivariada de análise de componentes principais (ACP). O programa THE UNSCRAMBLER[®] versão 9.2, 1986-2000 e Excel 2007 foram utilizados para tal averiguação.

Os parâmetros utilizados são representados por: B (biorremediação), P (proteína), AR (açúcares redutores), SS (sólidos solúveis), TS (tensão superficial), EEQ (estabilidade da emulsão em querosene), EEH (estabilidade da emulsão em hexano), AE0,5Q (atividade de emulsificação a concentração salina de 0,5% em querosene), AE2,5Q (atividade de emulsificação a concentração salina de 2,5% em querosene), AE5,0Q (atividade de emulsificação a concentração salina de 5,0% em querosene) e AE15,0H (atividade de emulsificação a concentração salina de 15,0% em hexano).

A Tabela 11 mostra a contribuição numérica dos parâmetros, valores gerados a partir do programa THE UNSCRAMBLER[®] versão 9.2, em cada uma destas duas CPs, ressaltando que apenas o valor absoluto deve ser observado, pois os sinais + ou – indicam apenas em qual quadrante essas variáveis estão localizadas. Apenas essas duas CPs, CP1 (45%) e CP2 (34%) foram utilizadas para o estudo, pois explicam mais de 70% das amostras, não sendo

necessário discutir ou incluir no trabalho demais componentes principais.

Tabela 11-Contribuição numérica de cada parâmetro nas CP1 e CP2.

| Parâmetros | CP1 (X-Vars + Interactions) | CP2(X-Vars + Interactions) | |
|------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| В | -0,606 | 0,035 | |
| P | $-2,658.10^{-4}$ | $0,267.10^{-4}$ | |
| TS | $-3,458.10^{-2}$ | $-0.980.10^{-2}$ | |
| AR | 0,618 | $3,343.10^{-2}$ | |
| SS | $4,294.10^{-2}$ | $0,141.10^{-2}$ | |
| EEQ | -0,453 | -0,727 | |
| EEH | -0,154 | 0,689 | |
| AE0,5Q | $-1,903.10^{-2}$ | $-1,764.10^{-2}$ | |
| AE2,5Q | $-8,320.10^{-2}$ | $-4,276.10^{-2}$ | |
| AE5,0Q | 1,291.10 ⁻² | $8,647.10^{-2}$ | |
| AE15,0H | -0,108 | -1,788.10 ⁻⁴ | |

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

De acordo com a Tabela 11, oito parâmetros (B, P, TS, AR, SS, AE0,5Q, AE2,5Q e AE15,0H) tiveram seus maiores valores absolutos para a CP1, contribuindo para a explicação dos mesmos, enquanto que para a CP2 apenas três parâmetros (EEQ, EEH e AE5,0Q) contribuiram estatisticamente com a explicação.

A Figura 39 mostra a ACP para os *scores* das amostras e a interpretação de todos os experimentos que envolveram as 14 amostras dos biossurfactantes, além do SLS[®] e da *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682). A Figura 39 expõe o *x-loadings* da ACP que contém os 11 parâmetros estudados ao longo dessa pesquisa, no qual é a representação gráfica da Tabela 11.

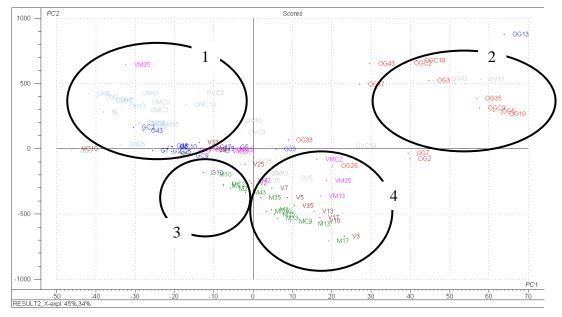


Figura 39-ACP das amostras estudadas.

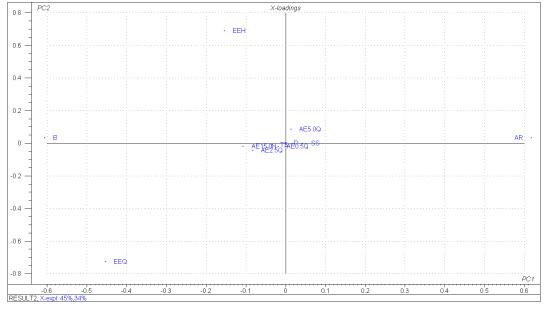


Figura 40-ACP dos parâmetros estudados.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A Figura 41 representa as fontes de carbono dessas amostras, com o intuito de estabelecer uma visualização mais clara para a explicação desta ACP. Nela, a seguinte legenda é válida: G=1; OG=2; M=3; OM=4; V=5; OV=6 e VM=7.

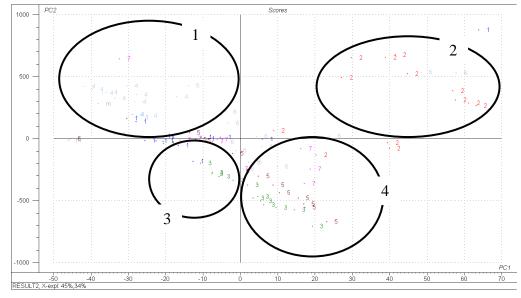


Figura 41-Representação das amostras conforme suas fontes de carbono.

Sobrepondo-se as Figuras 39 e 40, obtêm-se os pontos mais extremos e as maiores contribuições dos parâmetros. Consequentemente chegam-se às amostras e variáveis que têm suas explicações atreladas a cada componente principal. A CP1, por exemplo, para o grupo 1, possui as amostras com os maiores potenciais de biorremediação do petróleo, que incluem todos biossurfactantes provenientes do meio mineral suplementado com manipueira e óleo residual de fritura, facilmente observado pela numeração 4 na Figura 41, além das amostras VM35, GC2, G43, SLS® e a *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682). Essas amostras também possuem os menores teores de açúcares redutores, menores quantidades de sólidos solúveis e menores valores de tensão superficial.

Tais resultados comprovam que os isolados contêm biossurfactantes capazes de reduzir grandemente a tensão superficial da água, além de desempenharem ótimos potenciais de biorremediação, mostrando ainda que a produção em meio de manipueira suplementado por óleo residual de fritura (OM) é uma ótima fonte alternativa para a produção de biossurfactante.

Ainda pela sobreposição das Figuras 39 e 40, a observação válida para o grupo 1 ocorre inversamente com o grupo 2, onde os biossurfactantes, em sua maioria proveniente do meio mineral padrão suplementado com glicose e óleo (OG), geraram seus menores potenciais de biorremediar o óleo cru durante o presente estudo.

Quanto ao grupo 3, representados principalmente por biossurfactantes produzidos em meio suplementado apenas com manipueira, foram obtidas as maiores atividades emulsificantes na presença do querosene, em concentrações salinas de 0,5 e 2,5%, além de 15% quando o substrato utilizado foi o hexano.

Quanto ao grupo 4, observou-se que os biossurfactantes, representados pela vinhaça e, em sua maioria, pela manipueira, possuem uma grande quantidade de proteína. Apesar de não se ter feito a caracterização química desses biossurfactantes produzidos, pode-se levantar a hipótese de que esses caldos de fermentação podem ter uma natureza química de alto peso molecular ou misturas complexas de compostos que contêm proteínas, como por exemplo, as lipoproteínas.

Como apenas 3 parâmetros explicam a CP2, observou-se que a maior interferência nessa componente principal é do grupo 3, que apresenta uma maior estabilidade da emulsão com querosene, porém uma menor estabilidade quando o substrato para estabilizar a emulsão passa a ser o hexano. Observação contrária é acometida ao grupo 1.

Neste estudo, fez-se uma varredura das variadas fontes de carbono alternativas (vinhaça, manipueira e óleo residual de fritura) para a suplementação do meio mineral, diferentemente do padrão utilizado, a glicose, para a produção de biossurfactantes, potencial de biorremediação, consumo de açúcares e estabilidade da emulsão em querosene ou hexano, visando validar os experimentos realizados.

Chegou-se à conclusão de que os biossurfactantes produzidos em meio suplementado com manipueira e óleo de fritura tiveram o maior potencial de biorremediação, menores valores de tensão superficial, menores quantidade de açúcares redutores ao final do processo fermentativo de produção dos mesmos e maiores estabilidades de emulsão quando em hexano.

6 CONCLUSÃO

No isolamento, crescimento e caracterização morfológica e bioquímica dos microorganismos foram obtidos 32 micro-organismos isolados a partir de resíduos agroindustriais de manipueira, vinhaça, provenientes de indústrias da região e óleo residual de fritura, adquirido em um restaurante. Destes, 22 foram bactérias entre Gram negativas e positivas e na sua maioria catalase positiva, indicando um metabolismo aeróbico. Também foram identificados 4 bolores e 6 leveduras.

Dos micro-organismos isolados provenientes da manipueira, 35% apresentaram potencial de biodegradação, sendo os primeiros resultados já observados em apenas 2 horas de contato com o agente oxidante DCPIP. Dos isolados provenientes da vinhaça, apenas 20% conseguiu reduzir o DCPIP, enquanto que para o óleo residual de fritura, 30% dos micro-organimos apresentaram capacidade para biodegradar a fonte oleosa envolvida, ainda que em menor velocidade que os isolados da manipueira.

Estes resultados iniciais sugerem pelo teste da biodegradabilidade e pelo teste do colapso da gota 11 isolado microbianos 2,3, 5, 7, 10, 13, 17, 25, 33, 35 e 43, além dos microorganismos C2, C9 e C10, provenientes de pesquisas anteriores pelo LEEQ mostraram-se produtores de biossurfactantes.

A constatação de produção de biossurfactantes pelos micro-organismos citados foi testada em diferentes formulações de meio minerais suplementados com fontes alternativas de carbono como manipueira, vinhaça e óleo residual de fritura.

A maior qualidade de biossurfactantes quanto a potenciais de biorremediação do óleo cru (81%) e redução da tensão superficial da água (28 m/Nm), e maiores estabilidade de emulsão em hexano, foram observadas em processo fermentativo do óleo residual com a manipueira, validando a importância da fonte oleosa como indutora na produção de biossurfactantes. Esta observação foi ratificada pela técnica estatística de Análise por Componentes Principais (ACP).

A importância deste estudo visa externar a preocupação ambiental de reaproveitar resíduos agroindustriais e inserir a preocupação social como fruto de avanços tecnológicos, aliado à interdisciplinaridade, permitindo a viabilidade do desenvolvimento sustentável. Os biossurfactantes têm recebido crescente atenção nos últimos anos por sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e diversidade de aplicações e funcionalidade sob condições extremas.

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Partindo de que no trabalho se obtiveram 11 indivíduos microbianos detentores de propriedades tensoativas, com altos potenciais biodegradadores de petróleo e com capacidade expressiva de reduções da tensão superficial da água em meio mineral suplementado com manipueira e óleo residual de fritura, sugere-se como próximos passos a serem realizados:

- Identificação, em gênero e espécie, das bactérias e leveduras produtoras de biossurfactantes;
- Identificação dos tipos de biossurfactantes que foram produzidos por tais micro-organismos;
- Estudo cinético do crescimento celular dessas células microbianas e avaliação da tensão superficial ao longo do processo fermentativo pra se conhecer o início e o final da produção desses bioprodutos;
- Determinação da atividade de emulsificação frente a variáveis como temperatura e pH, pois uma vez identificados os principais fatores que afetam a qualidade e o rendimento do biossurfactante, tem-se como montar uma estratégia para encontrar valores ótimos, buscando a otimização do processo de produção dos biossurfactantes.

REFERÊNCIAS

A. O. A. C. (Associaton of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**. 14. ed. Arlington: A.O.A.C., p. 1141, 1984.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. **Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by** *Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 2008. 223(1-3). p. 143-151.

ABU-RUWAIDA, A. S. et al. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and deviation. **Acta Biotechnologica**, v.11, n. 4, p.315-324, 1991.

ACCORSINI, F. R. Isolamento de leveduras de um consórcio na produção de consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono. São Paulo, 2010. 89f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista.

AGRIANUAL. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2004.

AL-TAHHAN, R.A., SANDRIN, T.R., BODOUR, A.A. & MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.3 262–3268, 2000.

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de** *Yarrowia lipolytica* **em biorreator multifásico**. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standart Methods for the Examination of Water end Wastewater. 19th Edition. Washington, D. C., p.1155, 1995.

ANRAIN, E. Estudo sobre a aplicabilidade de reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo no tratamento de efluentes de fecularia. São Carlos, 1983. p. 256. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Curso de pós-graduação em Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo.

ANVISA (AGÊNCIAL NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais.** Resolução n°482, de 23 de setembro de 1999.

APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). **Standard methods for theexamination of water and wastewater**. 18. ed. Baltimore. v. 1. 1995.

ARIMA, K., KAKINUMA, A. & TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.31, p.488-494, 1968.

ASMER H.-J., LANG S., WAGNER F., WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.65, p.1460-1466, 1988.

ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J. Trehalose-containing glycolipids. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, v.16, p.59-99, 1978.

ATLAS, R. M. **Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems**. In: TRAINING WORKSHOP OF ICS-UNIDO ON "SOIL ENVIRONMENTAL

- ASSESMENT AND BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES", 1997.
- AUTRY, A. R.; ELLIS, G. H. Environmental program, v.11, p.318-323, 1992.
- BABU, P. S.; VAIDYA, A. N.; BAL, A. S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 263–268, 1996.
- BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v.51: p.1-12, 1995.
- BANAT, I.M., SAMARAH, N., MURAD, M., HORNE, R. & BANERJEE S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.80–88, 1991.
- BARANA, A. C. Cap. 11: **Digestão anaeróbia da manipueira.** IN: Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, São Paulo SP, 2000. v. 4. Fundação Cargill.
- BARROS, F. F. C.; MANO, M. C. R.; BICAS, J. L.; DIONISIO, A.; QUADROS, C. P.; UENOJO, M.; SANTOS, R. Dos; PASTORE, G. M. Optimization of the production of a Bacillus subtilis biosurfactant using response surface method. **Journal of Biotechnology**, v.131, n.2, s.1, p.173-174, 2007.
- BARTH, G.; GAILLARD, C.; Microbiology Review. v. 9, p. 219, 1997.
- BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v.27, n. 3, p.492-495, 2004.
- BENNETT, R.W.;LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. **Bacteriological and Analytical Manual Online**. FDA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition USA, 2001
- BERNARDI, J.V.E.; FOWLER, H.G.; LANDIM, P.M.B. *Um estudo de impacto ambiental utilizando análises estatísticas espacial e multivariada*. Holos Environmental, v.1: p.162-172. 2001.
- BIBETTE, J.; CALDERON, F. L.; POULIN, P. Emulsions-basic principles. **Report Progress Physics**, v.62 (6), p.969-1033, 1999.
- BICCA, C. F.; FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. *Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus rubber and Rhodococcus erythropolis*. Brazilian Journal of Microbiology. v.30, p.231-236, 1999.
- BODOUR, A. A., et al. Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel Class of Biosurfactants Produced by Flavobacterium sp. Strain MTN11. **Applied Environmental Microbiology**. v. 70(1), p. 114-120, 2004.
- BODOUR, A.A. & MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microrganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p.273-280, 1998.
- BOGNOLO, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and surfaces. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v.152, n. 1, p.41-52, 1998 e 1999.
- BOOPATHY, R. Factors Limiting Bioremediation Technologies. **BioResource Technology**, v.72, p.63-67, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**.

- v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUENO, S.M. et al. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas . **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p.121 126, 2002.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p.520, 1998.
- CAMEOTRA, S.S. & SINGH, P. 2009. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. Microbial Cell Factories, 8:16.
- CAMERON, D.R., COOPER, D.G. & NEUFELD, R.J. The Mannooprotein of the *Saccharomyces cerevisiae* is a effective bioemulsifier. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.1420-1425, 1988.
- CARA, D. V. C. **Produção de biossurfactantes por Flavobacterium sp. a partir de óleo de soja residual e fertilizantes comercial**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CELLA, R. C. F.; REGITANO-D ARCE, A. B. & SPOTO, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. Campinas . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, n. 2, p.111-116, 2002.
- CEREDA, M. P. **Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil.** São Paulo, Paulicéia, 1994. p. 174.
- CHA, D. K. The effect of biosurfactants on the fate and transport of nonpolar organic contaminants in porous media. **Environmental Engineering**, v.1, p.1-17, 2000.
- CHEN, J., SONG, X., ZHANG, H.; QU, Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from Wicker-hamiella domercqiae. **Enzyme Microbial Technology**, v.39, p.501-506, 2006.
- CHERNICHARO C. A. L. **Reatores anaeróbios.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG,1997, p.246 (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 5).
- CHRISTOFF, P. Óleo residual de fritura da Associação Vira Combustível (Biodiesel), 2006. UNIFAE Centro Universitário Franciscano do Paraná, Curso de Engenharia de Produção e de Engenharia Ambiental, Licenciado em Química pela UFPR e Mestre em Desenvolvimento de Tecnologia (Biocombustível).
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field tudies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.
- CHU, W.; CHAN, K. H. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic organics. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.307, n. 1/3, p.83-92, 2003.
- CIRIGLIANO M.C, CARMAN G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology**. v.48, 4: p.747–750, 1984.
- CLARK, L. B., ROSEN, R. T., HARTMAN, T. G, LOUIS J. B, SUFFT, I. H, LIPPINCOTT, R. L., ROSEN, J. D. Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic a c i dderivatives in drinking water by particle beam liquid chromat graphy/ mass spectrometry. **International Journal Environmental Anal Chemical**; v.47: p.167-180, 1992.
- CONCEIÇÃO, M. M.; CANDEIA, R. A.; DANTAS, H. J.; SOLEDADE, L.E.B.;

- FERNANDES Jr., V. J.; SOUZA, A. G. Rheological Behavior of Castor Oil Biodiesel. **Energy & Fuels**, v.19, p.2185-2188, 2005.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface active compounds from microorganisms. **Advances** in **Applied Microbiology**, v.42, p.408-412, 1980.
- COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.173-176, 1984.
- COOPER. D.G., ZAJIC. J.E., GERSON, D.F. *Production of surface-active lipids by Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.4-10, 1979.
- COPPEDE, J. S.; FERNANDES, R. S; LATANZE, R.; KRONKA, E. A. M.; BENICASA, M. Assessment of biosurfactant produced from agro industrial waste potential for hydrocarboncontaminated soil bioremediation. In: FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY, Natal RN, Brazil, 2005.
- CORAZZA, R. I. Reflexões sobre o papel das políticas ambientais e de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas 'mais limpas' numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. In: Anais do III Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 1999. Recife, Pernambuco.
- CORTEZ, L., MAGALHÃES, P., HAPPI, J., Principais Subprodutos da Agroindústria Canavieira e Sua Valorização, **Revista Brasileira de Energia**, v.2, n°. 2, 1992.
- CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. &PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v.30: p.179, 2002.
- CRÓSTA, A.P. **Processamento Digital de Imagens de Sensoriamento Remoto**. Campina, São Paulo: IG/UNICAMP, 1992. p. 170.
- Daniel, et al., 1998: Daniel, H., Levenes, C., and Crepel, F. (1998) "Cellular mechanisms of cerebellar LTD. " **Trends.Neurosci**. 21 (9), 401-407.
- DAS, M., DAS, S. K., MUKHERJEE, R. K. Surface active properties of the culture filtrates of a Micrococcus species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**. v. 63, p. 231-235, 1998.
- DAVILA, A.-M., MARCHAL, R. & VANDECASTEELE, J.-P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates. Journal of Industrial Microbiology, v.13, p.249–257, 1994.
- DEL BIANCHI, V. L. **Balanço de massa e energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do estado de São Paulo**. Botucatu, 1998. Tese (Doutorado) –, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista
- DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewale vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**. v. 7, p. 641-646, 2004.
- DESAI, B.B.; KOTECHA, P.M.; SALUNKE, D.K. Seeds handbook: biology, production, processing and storage. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 627.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. *Production of biosurfactants*. In: KOSARIC, N. (Ed.) Biosurfactants: production, properties, applications. New York: CRC Press, cap 1, p.19-98, 1993.

- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., DENNIE, D. BOISMENU, D., MAMER, O. A.; VILLEMUR. R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa strain 57RP grown on manitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1440: p.244-252, 1999.
- DI MAMBRO, V.M. **Desenvolvimento de formulações com superóxido dismutase:** avaliação da estabilidade física das formulações e da atividade enzimática. Ribeirão Preto, SP, 2001. 138f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- EHRLICH, G. G. SCHROEDER, R. A., MARTIN, P. Microbial populations in a jet fuel contaminated aquifer at Tustin, California. Washington: U., 1985. Geological Survey Report, p.85.
- ELLIS, W. D. PAYNE, J. R., MONABB, G. D. Treatment of contaminant soils with aqueous surfactants. Washington: USEPA/ORD, 1985.
- ESBENSEN, K.; SCHONKOPF, S.; MIDTGAARD, T. Multivariate Analysis in Practice. CAMO A/S. **Trondheim.** 1994.
- FAO-Food agricultural organization statiscal database. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 2008.
- FEIDEN, A. **Avaliação da eficiência de lagoas de tratamento de resíduos líquidos**. In: CEREDA, M.P. (Coord.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, v.4, cap.13, p.186-201, 2001.
- FERRAREZZO, E.M. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão. . Campinas-SP, 1998. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas
- FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulinamaxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Revista Microbiologia**, São Paulo, v.17, p.15-25, 1986.
- FIEBIG, R., SCHULZE, D., CHUNG, J-C., LEE, S. T. Biodegradation of biphenyls (PCBs) in the presence of a bioemulsifier produced on sunflower oil. **Biodegradation**, v. 8, p. 67-75, 1997.
- FIECHTER, A. Biosurfactans: moving towards industrial application. **Tibtech**, v. 10, p-217, 1992.
- FILIPE, E. J. M. Quando as moléculas se auto-organizam: micelas e outras estruturas supramoleculares. Fundação Calouste Gulbenkian, p.25-38. 1996.
- FIORETTO, R.A. **Uso direto da manipueira em fertirrigação.** In: CEREDA, M.P (coord): Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca. Vol IV. São Paulo: Fundação CARGILL, 2002. p. 67 79.
- FIRESTONE, D., STIER, R.F., BLUMENTHAL, M.M. Regulation of frying fats and oils. **Food Technology**, v. 45, n. 2, p. 90-94, 1991.
- FOUNTAIN, J.C.; KLIMEK, A.; BEIKIRCH, M.G.; and MIDDLETON, M.T. The use of surfactants for in situ extraction of organic pollutants from a contaminated aquifer. **Journal of Harzardous Materials**. v. 28. p. 295-311, 1991.
- FRANÇA, I. W. L; OLIVEIRA, D. W. F.; MONTENEGRO, D.L.; MARTINS, J.J.L.;

- GIRO, M.E.A., MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. 2010. Influência daconcentração de substrato na produção de biossurfactante por *Bacilus subtilis* LAMI005. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açucar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p.203.
- FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, v. 82, p. 124-128, 2007.
- GARTSHORE, J. Y. C. L.; COOPER, D. G. Quantitative analysis of biosurfactants using fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Biotechnology Letters**. v. 22, p. 169-172, 2000.
- GASPAR, R. M. B. L. Utilização de biodigestores em pequenas e médias propriedades rurais com ênfase na agregação de valor: um estudo de caso na região de Toledo-PR. Florianópolis, 2003. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina.
- GAUTAM, K.K.; TYAGI, V.K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p. 155-166, 2006.
- GEORGIOU, G., LIN, S.C. & SHARMA, M.M. 1992. Surface-active compounds from microrganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65.
- GHURYE, G. L.; VIPULANANDAN, C. A practical Approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 44, p. 661-666, 1994.
- GOBBERT, U., LANG, S. & WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of Torulopsis bombicola VR-8 isolate. Biotechnology, 6, 225-230, 1984.
- GONÇALVES, C. A. S.; SILVA, E. L. **Tratamento físico-químico da vinhaça**. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.
- GONZÁLEZ, G.; LEY, R. E.; SCHIMIST, S. K.; ZOU, X.; SEASTEDT, T. R. Soil ecological interactions: Comparisons between tropical and subalpine tropics. **Oecologia**. v. 128, p. 549-556, 2001.
- GOODLEY, J. A compendium DHI-water and environment. 4 ed., 2004.
- GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T., TULLOCH, A. P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from Torulopsis magnolia. Canadian Society for Chemistry, 9, 846-855.
- GREGERSEN, T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 124 127, 1978.
- GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". Journal of The Society of Cosmetic Chemists, 1, 311-326. 1949.
- GUERRA-SANTOS, L.H.; KAPELLI, O. & FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, p. 301-305, 1984.
- 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**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HAIR, J. F., TATHAM, R. L., ANDERSON, R. E., BLACK, W. Chapter 1 Introduction.

- In: Hair J.F., Tatham R.L., Anderson R.E., Black W. (Ed.). ed., Nova Jersey, 1998. Multivariate Data Analysis. 5, Pearson Education Inc., p. 23-45.
- HANDERSKI, F. Estudo de variáveis no processo de carbonatação do cobalto de cana-deaçúcar. Dissertação de Mestrado.Universidade Federal do Paraná, 148f. 2009.
- HANSON, K. G.; DUSAI, J. D.; DESAI, A. J., A rapid and simple screening technique for potencial crude oil degrading microorganism. **Biotechonilogy Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.
- HEAD, I.M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, p. 599-608. 1998.
- HEALY, M.G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. Resour. Conserv. Recyl. 18, 41, 1996.
- HOLMBERG, K. Natural Surfactants Current Opinion in Colloid & Interface Science, v. 6, p. 148-159, 2001.
- HOMME, R. K. & HUSE, K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida* (Torulopsis) *apicola*. Biotechnology Letters, 15, 853-858, 1993.
- HUA, Z., CHEN, J., LUN, S. & WANG, X. Influence of biosurfactants produced by Candida on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, v. 37, p. 4143-4150, 2003.
- ILORI, M.O., AMOBI, C.J. & ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp*. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**. v. 61, p. 985-992, 2005.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1.: **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos,** 3. ed. Sao Paulo: IMESP, p.245-246, 1985.
- JACKISCH-MATSURA, A. B.; DURRANT, L. R. **Reutilização de resíduo oleoso para produção de biossurfactante microbiano**. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, Campinas-SP, Brazil, 2005.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I. & CAMARGO; F.A.O. Biorremediação de soloscontaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**. v. 37 (4): p. 1192-1201, 2007.
- JAIN, D. K.; COLLINS-THOMPSON, D. L.; LEE. H.; TREVORS, J. T. A drop-collapsing test for screening surfantant producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 271-279. 1991.
- JARDIN, W. F., PASQUINI, C., GUIMARAES, J. R., DEFARIA, L. D. Shortterm toxicity test using Escherichia coli: Monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Water Environmental Resource**. v. 24, p. 351-354. 1990.
- JOLLIFFE, I. T. **Principal Component Analysis**, Springer Series in Statistics, second edn, Springer, 2002.
- KAISER, K. L. E.; DEVEVILLERS, J. Ecotoxicity of chemicals to Photobacterium phosphoreum. J. Devillers (ed.). **Handbooks of Ecotoxicological.** v. 2, p. 547-548. 1994.
- KAPPELI, O.; FINNERTY, W.R. Partition of alkane by an extracelular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 140, p. 707-712, 1979.
- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Bangalore: Current Science**. v. 77(1), p. 116-126, 1999.

- KIM, Y. B.; RHEM, H. J. Studies on a mixed culture of *Candida parapsilosis* and different bacilli on alkane. **European Journal Applied Microbiology**.v. 19, p. 112-119, 1982.
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 187-201, 2002.
- KLEKNER, V., KOSARIC, N. & ZHOU, Q.H., Sophorose lipids produced from sucrose. Biotechnology Letters, 13, 345–348, 1991.
- KOCH, A. K.; KAPPELI, O.; FIECHTER; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington v. 173, p.4212-4219, 1991.
- KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. Em Biosurfactants andbiotechnology. Surfactant science series. New York, 1987, cap.11.
- KRETSCHMER, A., BOCK, H.; WAGNER, F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 865-870, 1982.
- KUYUKINA, M. S., IVSHINA, I. B., PHILP, J. C., CHRISTOFI, N., DUNBAR, S. A. e RITCHKOVA, M. I. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 149-156, 2001.
- LACHMAN, L; LIERBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. 3 ed. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 514-517, 1986.
- LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12–20, 2002.
- LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.51:p. 22–23. 1999.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The uppgrading concept; (B) Pratical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198, 2003.
- LAYTON, A.C., GREGORY, B, SCHULTZ, T.W., SAYLER, G.S. Validation of genetically engineered bioluminescent surfactant resistant bacteria as toxicity assessment tools. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 43, p. 222–228, 1999.
- LEONEL, M., CEREDA, M. P. Manipueira como substrato de processo biológico. I: caracterização do substrato armazenado a temperatura ambiente. Revista Brasileira Mandiova. v. 15, n.1/2, 1996.
- LEONEL, M.; CEREDA, M.P.. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.2,p.299-304, 1995.
- LIMA, A. S.; DONALD, R. D. M.; CARDOSO, G. B. Influence of carbon source on the biosurfactants produced by bacteria isolated by petroleum contaminated soil. In: FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY, Natal RN, Brazil, 2005.
- LIMA, T.M.S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. (Tese de doutorado) Universidade Federal de Viçosa, 174p, 2007.
- LIN, S.-C., CHEN, Y.-C.; LIN, Y.M. General approach for the development of high-

- performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. **Journal of Chromatografy A.** v. 859, p. 149-159, 1998.
- LINDLEY, N.D.; HEYDEMAN, M.T. Mechanism of dode-cane uptake by whole cells of *Cladosporium resinae*. **Journal of General Microbiology.** v. 132, p. 751-756, 1986.
- LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN. W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. Biotechnology Bioengineering, v. 33, p. 365-368, 1987.
- LUKSSENBERG, J. A.; SÁ, A.; DURSO, M. N. **Processo para a produção do álccol combustível, sem vinhoto**. In: Relatório descritivo da patente de invenção, 1980. Dyna Engenharia S.A..
- LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Bioogy and Technology**. v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Sinthesys of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- MANDRI, T. & LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**. v. 6 (1): p. 023-02, 2007.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quimica Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.
- MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Rio Claro São Paulo, 2006. Tese (Doutorado) Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste watwr as medium. **Food Chemistry**, v.101, p. 345-350, 2007.
- MASSON, D.S. Desenvolvimento e da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes. Ribeirão Preto, SP, 2005.. 163f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- MEHER, L. C., SAGAR, D. V., NAIK, S. N., Technical aspects of biodiesel production by transesterification a review. **Renewable and Sustainable Energy Review**. v. 10. p. 248-268, 2006.
- MENDONÇA, C.R.B.; BICA, C. I. D.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; RAMIS-RAMOS, G.; PIATNICKI, C. M. S.. Physical chemical properties and kinetics of redox process in water/soybean oil microemulsions. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 19, p. 775-781, 2008.
- MERCADÉ, M. E.; MONLEON, L.; DE ANDRES, C.; RODON, I.; MARTINEZ, E.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, A. Screening and selection of surfactant-producing bacteriarom waste lubricating oil. **Journal Applied Bacteriology**, v.81, p.161–168, 1996.
- MIHELCIC, J.R., LUEKING, D.R., MITZELL, R.J. & STAPLETON, J.M. Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. **Biodegradation**. v. 4, p. 141–153, 1993.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31: p. 426-428, 1959.

- MINATTI, E. Um novo modelo para a interação entre polímeros neutros hidrossolúveis e surfactantes. Santa Catarina, 2005. Tese (Doutorado) Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.
- MITTELBACH, M.; TRITTHART, P. Diesel fuel derived from vegetable oils, III. Emission tests using methyl esters of used frying oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 65, n. 7, p.1185-1187, 1988.
- MOHAMED, A. M. O.; EL GAMAL, M.; ZEKRI, A. Effect of salinity and temperature onwater cut determination in oil reservoirs, **Journal Pet. Science Engineering**., v. 40, p. 177-188, 2003.
- MOITA NETO, J.M. & MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados.Revista **Química Nova**, SBQ, v. 21, n. 4, jul.-ago. 1998.
- MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M. ESTEVES, J. L & SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from Bacillus subtilis: Biodegradation vol. 11, pp. 65-71. 2000.
- MULLIGAN, C. N., YONG, R. N. & GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**. v.85, p. 111-125, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution.** v. 133, p. 183-198, 2005.
- NENDZA, M.; SEYDEL, J. K. Quantitative structure toxicity ralationships for ecotoxicologically relevant biotest systems and chemicals. **Chemosphere**. v. 17, p. 1585-1602. 1988.
- NETO, A. E.; NAKAHODO, T., **Caracterização Físico-Química da Vinhaça, Relatório Técnico da Seção de Tecnologia de Tratamento de Águas**. Piracicaba-S.P, 1995. 26f. Projeto nº 9500278. Centro de Tecnologia Copersucar.
- NITSCHEKE, M; PASTORE, G. M PASTORE. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336–341, 2006.
- NITSCHKE, M. et al. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-596, 2004.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microrganisms for biosurfactante production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- OLLIS, D. Slick solution for oil spills. Nature. v. 358: p. 453-454, 1992.
- PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida* liposurfactant by a known oil degrader. In Ocean Technology Per-lytica: formation of a biosurfactant. Effects on respiratory activity spectives ed. Kumar, S., Agadi, V.V., Keshavdas, V. and Desai, and growth. **Applied Microbiology Biotechnology.** v. 8, p. 91-101,1979.
- PARIZOTTO, A.A. Eficiência de lagoas de sedimentação na remoção de cargas orgânicas, nutrientes e coliformes totais em despejos industriais de fecularias. 1999. 113 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Meio Ambiente) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

- PASSERI, A., SCHIMDT, M., HAFFNER, T., WRAY, V. LANG, S., WAGNER, F. Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37: p. 281 286, 1992.
- PATEL, R.; DESAI, A. J.Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa GS3 from molasses. Letters in Applied Microbiology, Oxfrd, v.25, p.91-94, 1997.
- PERAZZOLO, L. M. Coloração de Gram: Princípios e Características. Notas de aula. Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: < http://www.liaaq.ufsc.br/aulas/Gram%20complemento.PDF. Acesso em: 21 mar. 2011, 20:37.
- PEREIRA, E. *et al.* Desenvolvimento de processos de produção de bioediesel a partir de resíduos de óleos vegetais. In: X Salão de Iniciação Científica PUCRS, p.3373-3375. 2009.
- 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.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais**. Fortaleza-CE, 2005 In: Comunicado técnico EMPRAPA. 1ª ed e on line, p. 102.
- PIRRÔLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, São Paulo, 2006. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- PORTER, M. R. **Handbook of surfactants**. London: Blackie Academic e Professional, 1994.
- RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN. S.; MARCHANT, R., BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. Biotechnology Program, v.18, p. 1277-1281, 2002.
- RAU, U., MANZKE, C., WAGNER, F. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. Biotechnology Letters, 18, 149–154, 1996.
- REDDY, K.R. & CHINTHAMREDDY, S.. Comparison of extractants for removing heavy metals from contaminated clayey soils. **Soil and Sediment Contamination**, v.9. p. 449-462, 2000.
- REISER, J.; KOCH, A. K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. Series; Oringer, J.W.; Tillinguest, H. S., eds.; Gulf Publishing Company: London. **Advances in Applied Biotechnology** cap. 3, 1989.
- RETEUNA, C., VASSEUR, P. & CABRIDENC, R. Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. **Hydrobiologia**. v. 188, p. 149-153, 1989.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos, p.194. 2004.
- RIBO, J. M.; KAISER, K. J. E. Photobacterium phosphoreum toxicity bioassay, I. Test producedures and applications. **Toxicity Assessment**. v. 2, p. 305-323, 1987.
- ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; and VIERMA, L. Biosurfatants production by two isolates of *Pseudomas aeruginosa*. **World Journal Microbiloly Biotechnology**, vol. 8, p. 125-128. 1992.

- ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de Microbiologia**. Vol I.Editora Manole LTDA, 1988.
- ROSEN, M.J. **Surfactants and interface phenomena**. Hoboken, New Jersey, NY, 2004. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc.
- ROSENBERG, E. & RON, E. Z., Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**. v. 3 (4): p. 229-236. 2001.
- ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D. L.; **Applied Environmental Microbiology**. v. 37, p. 402, 1979.
- ROSSETTO, A. J. **Utilização Agronômica dos Subprodutos e Resíduos da Indústria Açucareira e Alcooleira**. In: PARANHOS, S. B. (Coord.) Canade-açúcar cultivo e utilização. Campinas:Fundação Cargill, 1987. p.433-504.
- ROSSMANN, M. Otimização da produção e propriedade tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melaço e manipueira. Minas Gerais, 2008. 112p. Dissertação (Mestrado e, Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Cnadida lipolytica* using industrial redidue as substrate. **World Journal Microbiology Biotecnhology**. v. 23, p. 734-741. 2007.
- SABATINI, D. A.; McINERNEY, M. J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T. Evaluation of submicellar synthetic surfactants versus biosurfactants for enhanced LNAPL recovery. **Final Report**, p. 1-57, 2006.
- SAICHEK, R.E. & REDDY, K.R. Electrokinetically enhanced remediation of hydrophobic organic compounds in soils: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 115–192, 2005.
- SALOMON, K. R., **Avaliação tecnico-Economica da Biodigestão Anaeróbia das Vinhaças**. Universidade de São Paulo, 2007. Trabalho apresentado no II GERA: Workshop de Gestão de Energia e Resíduos na Agroindustria Sucroalcooleira.
- SANTOS, T. M. B.; AQUINO, L. C. L.; CASTRO, A. A.; SILVA, G. F. Estudo do processo de transesterificação alcalina dos óleos de soja residual e refinado visando à obtenção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, v. 4. p. 1153-1160, 2007.
- SCHOLZ, C., MEHTA, S., BISHT, K., GUILMANOV, V., KAPLAN, D., NICOLOSI, R.; GROSS, R. Bioactivity of extracellular glycolpids: Investigation of potential anti-cancer activity of sophorolipids and sophorolipid derivatives. **Proc. Am. Chem. Soc. Polym. Preprints**. v. 39, p. 168-169, 1998.
- SENA MM; POPPI RJ; FRIGHETTO RTS; VALARINI PJ. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**. v. 23: p. 547-556. 2000.
- SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. International **Journal of Environmental Research and Public Health** . v. 6: p. 278-309, 2009.
- SGANZARELA, E. Biodigestor, uma solução. Porto Alegre, 1983. Agropecuária.
- SHAH, T. Groundwater and human development: challenges and opportunities in livelihoods and environment Water. **Scence. Technoogy**. v. 51. p. 27–37, 2005.
- SHAH, V., DONCEL, G. F., SEYOUM, T., EATON, K. M., ZALENSKAYA, I., HAGVER, R., AZIM, A. & GROSS, R. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-

- human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 49, 4093-4100, 2005.
- SHAH, V., JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of Restaurant Waste Oil as a Precursor for Sophorolipid Production. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 512-515, 2007.
- SHARAF, M.A.; ILLMAN, D. L. & KOWALSKI, B.R. Chemometrics. John Willey & Sons, Nova York, 1986.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **A new version of the ASSISTAT Statistical Assistance Software**. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando FL USA, 2006. Proceedings... USA: American Society of Agricultural Engineers, p. 393-396.
- SINGH, A., VAN HAMME, J.D. & WARD, O.P. Surfactants in Microbiology and biotechnology: part 2. **Application Aspects Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99–121. 2006.
- SOBRINHO, H. B. de S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes por** *Candida sphaerica*. 2007. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento de processos ambientais) Universidade Católica de Pernambuco.
- SORIANO, A. U.; PEREIRA, N. Oily sludge biotreatment. **Biodegradation**. v.8: p. 220-232, 1998.
- SOUZA et al. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. In: 3º Congresso Brasileiro de Petróleo e Gás –IBP. Salvador, Bahia, 2005.
- STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. London. **Food Chemistry**. v. 52, n. 4, p. 353-360, 1995.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of Fermentation Technology. Second Edition. Butterworth Heinemann. **Elsevier Science**. p. 357. 1995.
- SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.
- TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P. & LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizadosna remediação de sítios contaminados. **Química Nova**. v. 27 (3): p. 441-446, 2004.
- TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 258–263, 1994.
- TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U., **Minimização de Resíduos na Indústria de Alimentos**: Revisão. B. CEPPA, 18 (2), p. 221-236, 2000.
- TONINI, R. M. C. W; REZENDE, C. E de & GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**. v. 14(4): p. 1025-1035. 2010.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia.** Porto Alegre: Artmed, 2006. 8ª edição, 1ª reimpressão, p. 894
- TRUMMLER, K.; EFFENBERGER, F.; SYLDATK, C. An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. European Journal of Lipid Science and Technology, v.105, p. 563-571, 2003.

- TSUGAWA, R., NAKASE, T., KOYABASHI, T., YAMASHITA, K. & OKUMURA, S.. "Fermentation of n-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts", **Agricultural Biological Chemistry**. v.33, p.929-938, 1969.
- TULOCH, A. P., HILL, A., SPENCER, J.F.T. Structure and relations of lactonic and acidic sophorosides of 17-hydroxyoctadecanoic acid. Canadian Journal of Chemistry, 46, 3337-3351, 1968.
- VAN BEELEN, P.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediments. **Chemosphere.** v. 34, p. 455-499, 1997.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.67 (4): p. 503-54, 2003.
- VOLKERING, F., BREURE, A.M., VAN ANDEL, J.G. & RULKENS, W.H. Influence of non-ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 16, p. 1699-1705, 1995.
- WEI, Y.H.; CHU, I.M.. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p. 724-728, 1998.
- WEST, C.C.; HARWELL, J.H. Surfactant and surface remediation. **Environmental Science Technology**. v.26, p. 2324-2330. 1992.
- WILLUMSEN, P. A. & KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**. v.7, p.415 423, 1997.
- WOODS JR.; CHARLES E. Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media. 2004. Dissertação (Mestrado). Mississippi State University, p.28.
- YAKUBU, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. African **Journal of Biotechnology**, v.6 (24): p.2735-2739. 2007.
- YASMIN, J.A.A., GUPTA, H.N., BANSAL, B.B., SRIVASTAVA, O.N., Effect of combustion duration on the performance and emission characteristics of a sparkignition engine using hydrogen as a fuel. **International Journal of Hydrogen Energy** v.25, p.581–589, 2000.
- ZANA, R. Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases . **Surfactant science series.** New York: CRC Press, v.125. p. 539, 2005.
- ZHOU, Q.H., KLEKNER, V. & KOSARIC, N. *Production of sophorose lipids by Torulopsis bombolica from safflower oil and glucose*. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.69, p.89–91, 1992.