

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

CONCENTRAÇÃO EM COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA
DE SURFACTINA OBTIDA A PARTIR DE *BACILLUS sp* ITP - 001
ISOLADO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO

Autor: Anderson Philiply Cabral Alves.

Orientadores: Prof. Dr. César Costapinto Santana.

Prof^ª. Dra. Cleide Mara Faria Soares.

ARACAJU, SE - BRASIL.

MARÇO DE 2013

CONCENTRAÇÃO EM COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA
DE SURFACTINA OBTIDA A PARTIR DE *BACILLUS sp* ITP - 001
ISOLADO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO

Anderson Philiply Cabral Alves

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO
REQUISITO NECESSÁRIO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovada por:

Prof. César Costapinto Santana, Dr.

Prof^a. Cleide Mara Faria Soares, Dra.

Prof. Álvaro Silva Lima, Dr.

Prof. Daniel Pereira da Silva, Dr.

Prof. Roberto Rodrigues de Souza, Dr.

ARACAJU, SE - BRASIL.

MARÇO DE 2013

A474c Alves, Anderson Philippy Cabral
Concentração em coluna de bolhas e espuma de surfactina obtida a partir de *BACILLUS sp.* ITP – 001 isolado de solo contaminado por petróleo / Anderson Philippy Cabral Alves ; orientação [de] Dr. César Costapinto Santana, Dra. Cleide Mara Faria Soares. – Aracaju: 2013.

85 p. ; il.
Inclui bibliografia.

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como requisito necessário para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processo.

1. *Bacillus sp.* ITP 001 . 2. Surfactina. 3. Coluna de bolhas e espuma. 4. Recuperação. 5. Enriquecimento. I. Santana, César Costapinto. II. Soares, Cleide Mara Faria. III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 661.185

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela graça alcançada, e por ter me dado muita calma e persistência diante os desafios do mestrado.

A minha mãe Antoniêta pelo incentivo emocional e por suas orações dedicadas a mim e ao meu pai Geraldo pelo grande apoio econômico e incentivo para estudar, e por serem meu porto seguro nas horas mais difíceis. A toda minha família que mesmo ausente sempre torceram pela minha vitória.

Aos meus orientadores, Dr. César Costapinto Santana e Dra. Cleide Mara Faria Soares, por aceitarem me orientar.

Aos professores do mestrado que contribuíram, direta ou indiretamente com seus conceitos durante as disciplinas lecionadas no mestrado, e também na realização desta dissertação. Em especial ao Dr. Daniel Pereira da Silva e ao Dr. Álvaro Silva Lima pelos conselhos durante os seminários de dissertação, os quais tenho admiração pela compreensão e profissionalismo.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA/ITP), Núcleo de Estudo em Sistemas Coloidais (NUESC/ITP), Laboratório de Estudos Ambientais (LEA), Laboratório de minimização e tratamento de Efluentes (LMTE/ITP), Laboratório de Bioprocessos (LEB/ITP) e ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM/UFS).

Aos meus colegas do LPA e do NUESC, em especial aos meus amigos: Vanessa, Maíra, Roneval, Acenine, Luana, César e Joanna pela ajuda e pelos momentos agradáveis vividos no laboratório LPA e no NUESC durante esses dois anos.

E gostaria de agradecer ao estagiário Eduardo, que me ajudou muito na parte laboratorial contribuindo assim para que esta dissertação se concretizasse.

A Doutora Anita e Dr. Roberto Rodrigues de Souza pela presteza e compreensão no uso de equipamentos no Laboratório de Biotecnologia (LABAM) situado na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

A todos os funcionários e professores do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Nuesc e da Universidade Tiradentes que contribuíram direta ou indiretamente para realização desta dissertação.

A CAPES - FAPITEC, pelo suporte financeiro. Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e a Universidade Tiradentes (UNIT) e Laboratório de Biotecnologia (UFS) por disponibilizar o espaço para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós – graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar por meio do método de adsorção gás-líquido em coluna de bolhas e espuma a concentração de soluções de surfactina produzida por fermentação em um agitador orbital utilizando *Bacillus sp* ITP 001. O mecanismo para o fracionamento de surfactina envolveu a injeção de gás nitrogênio (20, 40 ou 60 mL/min) na base da coluna de líquido contendo o material tensoativo em uma solução em pH 7,0, com concentrações iniciais de surfactina em 266,6, 425 ou 569,7 mg/L e temperatura de operação da coluna em 15, 25 ou 35°C . Após o contato do gás com a solução líquida, as moléculas tensoativas são adsorvidas na interface gás-líquido, formando assim uma coluna de espuma concentrada em biossurfactante, sendo posteriormente recuperado pela quebra da espuma através de um rompimento mecânico. O planejamento estatístico foi composto por um fatorial 2³ com 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios experimentais, verificando-se que para o enriquecimento médio as variáveis: vazão, concentração, temperatura e suas interações, foram significativas a um nível de confiança de 99%, ao passo que para recuperação da surfactina somente a vazão foi significativa a um nível de confiança de 99%. Obtiveram-se valores médios de enriquecimento e recuperação de surfactina oriundos do produto do topo (espuma). Os valores de enriquecimento médio da surfactina variaram entre 3,64 a 47,14 vezes, ao passo que para recuperação média da surfactina variaram de 83,10 a 98,69%. O maior valor de enriquecimento médio de surfactina (47,14 vezes) e recuperação média (98,69%) foram obtidos na menor concentração inicial de surfactina no caso 266,6 mg/L, maior temperatura de 35°C e menor vazão do gás nitrogênio de 20 mL/min para o presente estudo. Indicando que os resultados obtidos pelo método de fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma demonstra eficácia na concentração e recuperação da surfactina.

Palavras-chave: *Bacillus sp* ITP 001, surfactina, coluna de bolhas e espuma, recuperação, enriquecimento.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

The present work has a main goal analyze through gas-liquid adsorption method applied in a column of bubbles and foam the concentration of surfactin produced by fermentation in orbital Shacker using *Bacillus sp* ITP 001. The surfactin fractioning mechanism involved nitrogen gas injection (20, 40 or 60 mL/min) the base of the liquid column containing tensoactive material in a pH 7,0 solution, with surfactin initial concentrations of 266.6, 425 or 569.7 mg/L and column temperature operation at 15, 25 or 35 °C. After contact of the gas with the liquid solution, tensoactive molecules are adsorbed in the liquid-gas interface, forming a column of concentrated foam in biosurfactant, being recovered afterwards by the breakage of the foam through mechanical breakage. From the statistical planning containing a 2³ factorial plan with 3 central points, totalizing 11 experimental assays, it was proven that for further enrichment, the variables: flux, concentration, temperature and their interaction were significant with a confidence level of 99%, as for the recovery of surfactin only flux was significant at a confident level of 99%. Medium values of surfactin enrichment obtained varied from 83.1 to 98.69%. the highest surfactin enrichment values (47,14 folds) and recovery (98.69%) (were obtained in the smallest initial concentration of surfactin in the case of 266.6 mg/, highest temperature of 35 °C and lower nitrogen flux of 20 mL/min for the present study. Indicating therefore, through the best results, that the fractionation shows efficiency in the concentration and recovery of surfactin.

Keywords: *Bacillus sp* ITP 001, surfactin, column of bubbles and foam, recovery, enrichment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 BIOSSURFACTANTE DE ORIGEM MICROBIANA.....	4
2.1.2 CLASSIFICAÇÃO.....	6
2.1.3 PROPRIEDADES.....	10
2.1.4 APLICAÇÃO.....	13
2.2 ADSORÇÃO DE TENSOATIVO NA INTERFACE GÁS - LÍQUIDO.....	15
2.3 LEI DE ADSORÇÃO DE GIBBS.....	15
2.4 ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE LANGMUIR.....	18
2.5 ESPUMAS.....	18
2.6 MODOS DE SEPARAÇÃO.....	20
2.6.1 SEPARAÇÃO POR ESPUMA.....	20
2.6.2 SEPARAÇÃO POR BOLHA.....	22
2.7. RECUPERAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE SURFACTINA OBTIDA EM COLUNA DE FRACIONAMENTO VIA ESPUMA.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5 CONCLUSÕES.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7 ANEXO.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: REPRESENTAÇÃO DE UM SURFACTANTE MONOPOLAR	4
FIGURA 2.2: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E SOLUBILIDADE DO COMPOSTO ORGÂNICO COM A CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO.....	5
FIGURA 2.3: DEMONSTRAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE RAMNOLÍPIDEOS, TREHALOLÍPIDEOS E SOFOROLÍPIDEOS	8
FIGURA 2.4: ESTRUTURA QUÍMICA DA SURFACTINA.....	9
FIGURA 2.5: ESTRUTURA QUÍMICA DO EMULSAN	10
FIGURA 2.6: CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE E SOLUTO NA INTERFACE DE DUAS FASES	16
FIGURA 2.7: (A) COMPORTAMENTO TÍPICO DA TENSÃO SUPERFICIAL COM A CONCENTRAÇÃO PARA SOLUÇÕES COM ATIVIDADE SUPERFICIAL (B) COMPORTAMENTO DE Γ COM C (ISOTERMA DE ADSORÇÃO).....	17
FIGURA 2.8: ESTRUTURA DE UMA ESPUMA CONTITUÍDA POR UMA FASE GASOSA E UMA FASE LÍQUIDA (FILMES E CANAIS DE PLATEAU).....	19
FIGURA 2.9: DIFERENTES EFEITOS DURANTE A FORMAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA ESPUMA ...	21
FIGURA 2.10: FENÔMENOS OCORRIDOS DURANTE O FRACIONAMENTO DA ESPUMA.....	22
FIGURA 2.11: ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS DE SEPARAÇÃO ENVOLVENDO O FENÔMENO DE ADSORÇÃO EM BOLHAS	23
FIGURA 2.12: ESQUEMA DO APARATO	24
FIGURA 2.13: APARATO UTILIZADO PARA FRACIONAMENTO DE ESPUMA NO MODO SEMI-BATELADA	26
FIGURA 2.14: APARATO UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE <i>BACILLUS subtilis</i> ATCC 21332 E COLETA DA ESPUMA	27
FIGURA 3.1: APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NO FRACIONAMENTO DE SURFACTINA EM COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA OPERADA EM MODO SEMI - BATELADA	31
FIGURA 4.1: GRÁFICO DE PARETO PARA ENRIQUECIMENTO MÉDIO DA SURFACTINA	39
FIGURA 4.2: GRÁFICO DE PARETO PARA RECUPERAÇÃO MÉDIO DA SURFACTINA	39
FIGURA 4.3: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O ENRIQUECIMENTO MÉDIO DA SURFACTINA COM A INTERAÇÃO DA VAZÃO COM A CONCENTRAÇÃO	40
FIGURA 4.4: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O ENRIQUECIMENTO MÉDIO DA SURFACTINA COM A INTERAÇÃO DA VAZÃO COM A TEMPERATURA	40

FIGURA 4.5: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O ENRIQUECIMENTO MÉDIO DA SURFACTINA COM A INTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO COM A TEMPERATURA	40
FIGURA 4.6: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA RECUPERAÇÃO MÉDIA DA SURFACTINA COM A INTERAÇÃO DA VAZÃO COM A TEMPERATURA	41
FIGURA 4.7: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA RECUPERAÇÃO MÉDIA DA SURFACTINA COM A INTERAÇÃO DA VAZÃO COM A CONCENTRAÇÃO	41
FIGURA 4.8: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA RECUPERAÇÃO MÉDIA DA SURFACTINA COM A INTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO COM A TEMPERATURA	42
FIGURA 4.9: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C).....	44
FIGURA 4.10: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C).....	44
FIGURA 4.11: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C).....	45
FIGURA 4.12: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C).....	45
FIGURA 4.13: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 425,0$ mg/L; $Q = 40$ mL/min; $T = 25$ °C).....	46
FIGURA 4.14: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C).....	46
FIGURA 4.15: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C).....	47
FIGURA 4.16: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C).....	47
FIGURA 4.17: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C).....	48
FIGURA 4.18: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C)	50
FIGURA 4.19: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C)	50
FIGURA 4.20: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C)	51
FIGURA 4.21: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C)	51

FIGURA 4.22: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 425,0$ mg/L; $Q = 40$ mL/min; $T = 25$ °C)	52
FIGURA 4.23: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C)	52
FIGURA 4.24: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C)	53
FIGURA 4.25: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C)	53
FIGURA 4.26: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA COM O TEMPO ($C_1 = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C)	54
FIGURA 8,1: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SURFACTINA PADRÃO	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1: CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	7
TABELA 2.2: DIFERENTES CONDIÇÕES PARA ADAPTAÇÃO DE <i>BACILLUS</i>	11
TABELA 2.3: RELAÇÃO DA ZONA DE INIBIÇÃO PARA ALGUNS MICROORGANISMOS	12
TABELA 2.4: APLICAÇÕES DOS BIOSURFACTANTES	13
TABELA 3.1: MEIO DE CULTURA	29
TABELA 3.2: VARIÁVEIS AVALIADAS COM SEUS RESPECTIVOS NÍVEIS UTILIZADO NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3	29
TABELA 3.3: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 EMPREGADAS NO ESTUDO DA RECUPERAÇÃO MÉDIA ($R_M\%$) E ENRIQUECIMENTO MÉDIO (E_M) DO BIOSURFACTANTE	30
TABELA 4.1: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS VALORES DE RECUPERAÇÃO MÉDIA ($R_M\%$) E ENRIQUECIMENTO MÉDIO (E_M) DE ACORDO COM UM FATORIAL 2^3 (VARIÁVEIS CODIFICADAS E VALORES REAIS).....	36
TABELA 4.2: ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O ENRIQUECIMENTO MÉDIO DA SURFACTINA	37
TABELA 4.3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RECUPERAÇÃO MÉDIA DA SURFACTINA	38
TABELA 4.4: VALORES DE SOLUÇÃO QUE PERMANECEM NA COLUNA DE LÍQUIDA AO FIM DO PROCESSO	49
TABELA 4.5: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA SURFACTINA AO FIM DA CORRIDA EXPERIMENTAL	55
TABELA 8.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA ATRAVÉS DE MEDIDAS DE TENSÃO SUPERFICIAL	70

ANEXO

APÊNDICE A: CURVA ANALÍTICA DA SURFACTINA PADRÃO

70

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes de origem microbiana são compostos sintetizados por uma grande variedade de organismos vivos (bactérias, fungos e leveduras), tornando uma efetiva alternativa para produção de biossurfactantes e posterior aplicação, pois, oferecem diversas vantagens em relação aos surfactantes químicos sintetizados do petróleo, como: baixa toxicidade, maior biodegradabilidade e estabilidade em variações extremas de pH (3 – 10), temperatura (30 - 120°C) e salinidade (0,5 – 15% de NaCl), implicando em uma ampla gama de aplicações em diversos setores industriais.

No entanto, quando os biossurfactantes são obtidos por meio de fermentação, os mesmos podem estar muito diluídos ou dissolvidos em pequena concentração no caldo fermentado. Portanto a possibilidade de concentrar / recuperar o biossurfactante em uma coluna de bolhas e espuma é um excelente processo, pois caracteriza uma técnica de baixo custo, uma vez que o consumo de energia é baixo e também ser efetivo na concentração / recuperação de materiais biológicos.

Com isso o processo de fracionamento de biossurfactante com intuito de concentrar / recuperar é baseado na adsorção das moléculas tensoativas na interface gás-líquido, ou seja, na parte inferior da coluna (base) é introduzida uma determinada vazão de gás na solução contendo o agente tensoativo, logo após, surge uma coluna de bolhas e posteriormente uma coluna de espuma, e essa espuma gerada que sai da coluna pode ser colapsada em um recipiente, obtendo assim uma solução líquida rica em material tensoativo, que no caso do presente estudo é a surfactina obtida através do *Bacillus sp* ITP 001, classificado assim como um lipopeptídeo.

Em relação à recuperação desse biossurfactante utilizando o processo de fracionamento em coluna de bolhas e espuma na literatura existem poucos estudos como no caso de DAVIS *et al.* (2001) e CHEN *et al.* (2006).

O principal foco deste estudo é o interesse em concentrar / recuperar a surfactina devido à sua aplicabilidade na biodegradação de hidrocarbonetos, diesel, recuperação

melhorada de petróleo (MEOR), indústria de alimentos como na panificação, em compostos aromáticos, na indústria de leite, em biofilmes, como agente antitumoral, anti- inflamatório e antiviral. E ainda devem-se salientar as suas propriedades relevantes, como por exemplo, a diminuição da tensão superficial, resistência a variações extremas de temperatura, pH, sanilidade, alta biodegradabilidade e atividade anti-microbiana.

A contribuição do estudo consiste na quantificação da redução da concentração do biosurfactante obtido por fermentação a partir do *Bacillus sp.* ITP-001 na coluna de bolhas e na determinação da recuperação e enriquecimento da concentração da surfactina no topo da coluna.

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar por meio do método de adsorção gás-líquido em coluna de bolhas e espuma a concentração de soluções de surfactina produzida por fermentação em um agitador orbital utilizando *Bacillus sp* ITP 001.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o método de adsorção gás-líquido em coluna de bolhas e espuma a concentração/recuperação de soluções de surfactina produzida por fermentação em agitador rotacional utilizando *Bacillus sp* ITP 001.

Objetivos Específicos

- Produzir biossurfactante de *Bacillus sp* ITP 001 em agitador orbital com o intuito de fracionar em uma coluna de bolhas e espuma;
- Determinar os melhores parâmetros (vazão superficial do gás, temperatura de operação da coluna e concentração inicial da solução) para recuperação e enriquecimento da surfactina coletada no topo da coluna.
- Otimizar o processo de concentração do biossurfactante *Bacillus sp* ITP 001 utilizando o planejamento de experimentos 2^3 com 3 pontos centrais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordadas algumas definições e fundamentações teóricas para a melhor compreensão do trabalho, e serão sub-divididos da seguinte forma: biossurfactante de origem microbiana; classificação; propriedades; aplicações; adsorção de tensoativo na interface gás – líquido; lei de adsorção de Gibbs; isoterma de adsorção por Langmuir; espumas; modos de separação; separação por espuma; separação por bolha; recuperação e enriquecimento da surfactina em coluna de fracionamento via espuma.

2.1 Biossurfactante de origem microbiana

Os biossurfactantes de origem microbiana são definidos como biomoléculas de superfície ativa, oriundos dos processos metabólicos dos micro-organismos tais como bactérias, fungos ou leveduras. São formados por uma porção hidrofóbica (grupo de cabeça polar) e outra porção hidrofílica, e possuem como característica notável a redução da tensão superficial e interfacial, aumento da solubilidade e uma baixa concentração micelar crítica (BENVEGNI *et al.*, 2008; MULLIGAN, 2007; MUKHERJEE *et al.*, 2006). A Figura 2.1 ilustra as partes que constituem os surfactantes monopolares.



Figura 2.1: Representação de um surfactante monopolar.

Fonte: Adaptado de BENVEGNI *et al.*, 2008.

E essas tensões superficiais e interfaciais refletem a localização das moléculas tensoativas nas interfaces gás-líquido e a concentração micelar crítica (CMC) é definida como a mínima concentração necessária para formação inicial das micelas. A tensão superficial esta relacionada com a concentração do surfactante até o limite da concentração micelar crítica (CMC). Em valores de concentração superiores a concentração micelar critica (CMC), a solubilidade do tensoativo aumenta e as tensões superficiais e interfaciais ficam praticamente constantes. Em compostos químicos como SDS (Dodecil sulfato de sódio) nota-se que o mesmo possui uma CMC de 2,4 g/L, enquanto que no caso dos biossurfactantes variam de 0,001 – 2 g/L, sendo assim mais eficiente devido à sua menor concentração micelar crítica (CMC). Na Figura 2.2 destaca-se o posicionamento de tais propriedades físicas em função da concentração do surfactante (MULLIGAN *et al.*, 2005; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

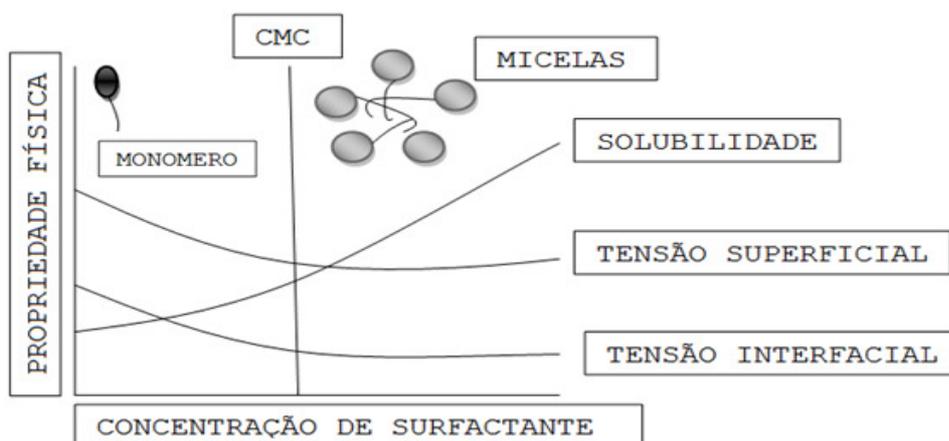


Figura 2.2: Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo.

Fonte: Adaptado de MULLIGAN *et al.*, 2001.

Em relação à produção dos biossurfactantes, foram inicialmente gerados em meios aquosos que priorizavam a pureza das fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais. Contudo, devido à variedade de substratos, subprodutos e resíduos de água residuária provenientes da área industrial ou agropecuária, contendo quantidades significativas de carbono, nitrogênio, vitaminas, sais minerais, óleos, gorduras ou uma misturas destes, e com isso esses rejeitos passaram a serem utilizados como uma alternativa para produção de biossurfactantes, uma vez que essa reutilização gera benefícios para o meio ambiente (MORAES, 2001; BOGNOLO, 1999).

De acordo com MUKHERJEE *et al.* (2006) a produção de biossurfactante ainda não se iguala aos surfactantes sintéticos, esse problema decorre dos altos custos e baixas recuperações envolvidos no processo para obtenção dos biossurfactantes, uma vez que os surfactantes químicos possuem elevada produtividade. Ou seja, para que seja viável a produção de biossurfactante devem ser considerados três fatores básicos:

- 1 – Os custos envolvidos na aquisição das matérias-primas;
- 2 – Produção econômica e procedimentos para recuperação;
- 3 – Rendimento do produto.

No entanto, devido os surfactantes químicos serem sintetizados a partir de derivados de petróleo, há uma tendência a conscientização aliada a legislações ambientais atuais, tendo como meio para amenizar tal problema o uso dos biossurfactantes. Apesar de que em países industrializados a utilização de surfactantes sintéticos oriundos do petróleo compreende estão em torno de 70 - 75%, enquanto que em países subdesenvolvidos existe a predominância de produtos de origem natural. Embora, nos países industrializados esteja ocorrendo uma necessidade para substituição desses surfactantes devido a fatores como: i - procura por produtos mais brandos, ii - diminuição de produtos não biodegradáveis e iii - especificidade dos produtos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; BOGNOLO, 1999).

E também devido os biossurfactantes serem compostos produzidos por uma variedade de microorganismos e conseqüentemente gerarem diferentes tipos de biossurfactantes com base em sua composição química, tais como glicolipídios, fosfolipídios e os lipopeptídeos produzidos a partir de diversos gêneros bacterianos como, por exemplo, a surfactina produzida pelo *BACILLUS subtilis* (BANAT *et al.*, 2010; FRANZETTI *et al.*, 2010) dentre outros.

2.1.2 Classificação

Segundo DESSAI & DESSAI (1993) os biossurfactantes classificam-se em: glicolipídios, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. A Tabela 2.1 destaca os tipos de biossurfactantes, sua classificação e seus respectivos microorganismos.

Tabela 2.1: Classificação dos biossurfactantes

TIPOS DE BIOSSURFACTANTE	MICRO-ORGANISMOS
Glicolipídios	
- ramnolipídios	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	- <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis apícola</i> .
- trehalolipídeos	- <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídeo - lipídeo	- <i>Bacillus licheniformis</i>
- viscosina	- <i>Pseudomonas fluorescens</i>
- serrawetina	- <i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	- <i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	- <i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	- <i>Bacillus brevis</i>
- polimixina	- <i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídios	
- ácidos graxos	- <i>Corynebacterium lepus</i>
- lipídios neutros	- <i>Nocardia erythropolis</i>
- fosfolipídeos	- <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	- <i>Candida lipolytica</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	- <i>varias bactérias</i>

Fonte: Adaptado de DESAI & BANAT, 1997.

Os glicolipídios na sua grande maioria são formações de carboidratos ligados a proteínas ou lipídeos, e são subdivididos em ramnolipídios, trehalopídeos e os sorofolipídeos. Na Figura 2.3 tem-se descritas as estruturas químicas dos ramnolipídios, trehalolipídios e soforolipídios. Os ramnolipídios são formados por uma ou duas moléculas de ramnose interligados a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxi-decanoico, e possui um rendimento de produção em torno de 100 g/L. Os trehalopídeos são produzidos por uma variedade de cepas tais como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Mycobacterium* composto de trealose e já os sorofolipídios são produzidos por uma variedade de leveduras, possuindo a capacidade de reduzir a tensão superficial e podendo ter rendimentos de produção acima de 400 g/L como no caso da *Candidabombicola* ATCC 22214 e fazem parte também os *Torulopsis magnolia*, *Tolulopsis gropengiesseri*, *Torulopsis bombicola* e *Candida bogoriensis* (BOGAERT *et al.*, 2011; LANG, 2002; DESAI & BANAT, 1997).

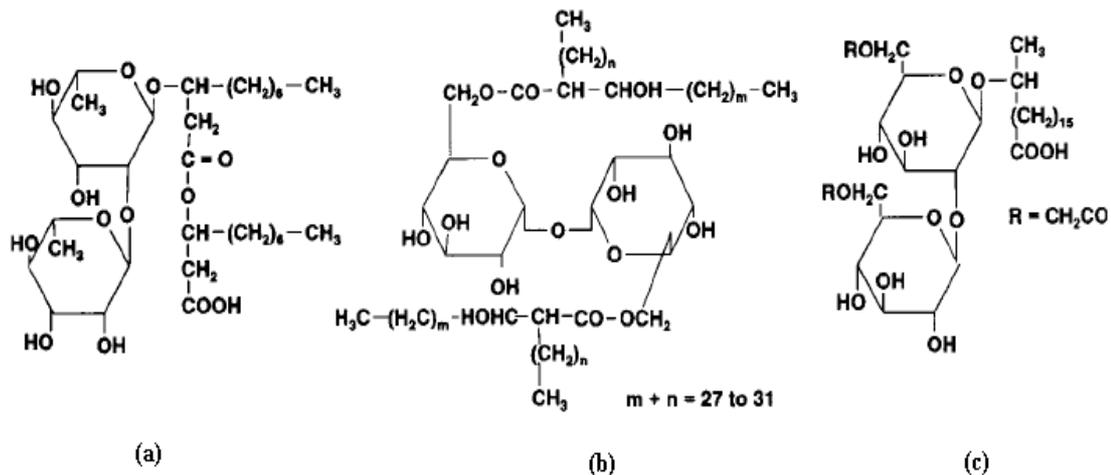


Figura 2.3: Estrutura de alguns glicolípídios comuns, (a) ramnolípídios tipo 1 *Pseudomonas aeruginosa*, em que duas ramnose estão ligadas por dois ácido β – hidroxidecanoico em uma cadeia lateral. (b) Trealose de *Rhodococcus erythropolis*, em que a trealose dissacarídeo está ligada a duas longas cadeias ramificadas a ácidos graxos β - hidroxí. (c) Soforolípídios a partir de *Torulopsis bombicola* em que a soforose dimerica está ligada a uma longa cadeia (C_{18}) de ácido graxo hidroxí.

Fonte: Adaptado de DESSAI & BANAT, 1997.

Os surfactantes particulados são oriundos de algumas bactérias e microorganismos como o *Acinetobacter calcoaceticus* que por meio de suas microvesículas extracelulares conseguem utilizar os hidrocarbonetos para formar micro-emulsões, ou seja, adsorver alcanos através das células microbianas. Essas vesículas contêm cerca de cinco vezes a quantidade de fosfolípídios em relação à membrana e trezentos e cinquenta vezes mais polissacarídios do que outras membranas de microorganismos (DESAI & BANAT, 1997).

Os lipopeptídios são bastante diversos em termos de estrutura e atividade biológica, e essa diversidade estrutural dá-se pela diferença de comprimento e composição da cadeia de ácidos graxos e devido às variações do número, tipo e configurações dos aminoácidos, são polipeptídios compostos de três a doze aminoácidos na sua formação estrutural e interligados a uma fração lipídica, possuindo a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial nas interfaces líquida, gasosa e sólida (RAAIJMAKERS *et al.*, 2006; ZOUBOULIS *et al.*, 2003; SULLIVAN, 1998). A surfactina é um dos exemplos de biosurfactantes estudados desde 1968, que a descrevem como um composto ativo que age na inibição da formação de coágulos de fibrina produzida por *Bacillus subtilis* (ARIMA *et al.*, 1968). Posteriormente sendo classificado como um lipopeptídico (PEYPOUX *et al.*, 1999), e constituído por sete peptídeos e uma porção lipídica, ou seja, uma mistura de ácidos graxos β-hidroxí com uma cadeia variando de treze a quinze átomos de carbono (DANA & PTAK, 1992; BAUMGART *et al.*,

1991; KLUGE *et al.*, 1988). A molécula de surfactina possui um peso molecular de aproximadamente massa/carga de 1050 (ARIMA *et al.*, 1968), e também conforme um estudo foram detectadas três diferentes isoformas para a surfactina contendo massas/carga de 1030,7; 1044,7 e 1058,7, e essas diferentes estruturas foram detectadas com a combinação de íons de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ por espectroscopia de massa MALDI – TOF (LEE *et al.*, 2012). A Figura 2.4 destaca a estrutura da surfactina, contendo os peptídeos L - Glu, L - Leu, D - Leu, L - Val, L - Asp, D - Leu e L - Leu ligados a uma cadeia de ácido graxos β - hidroxí.

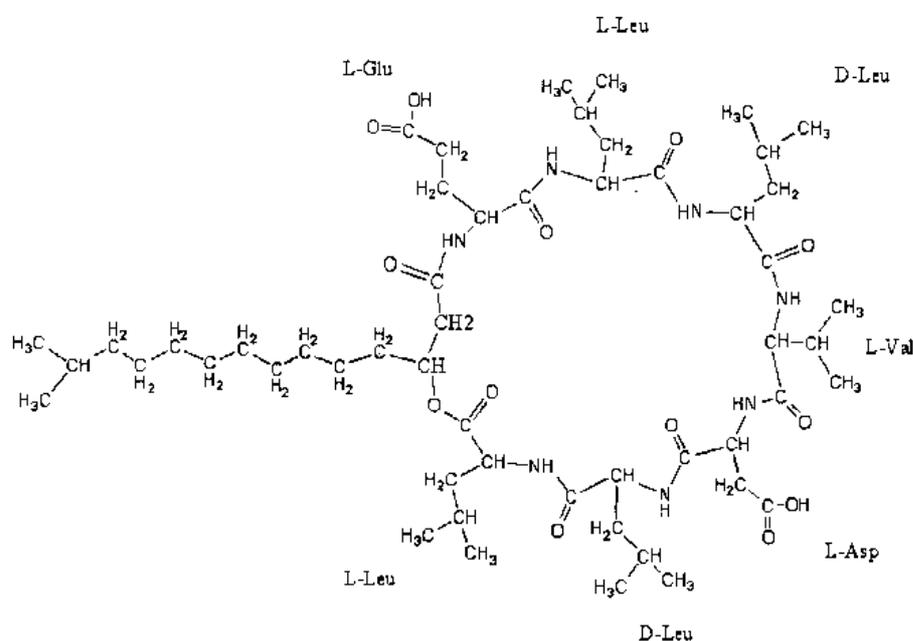


Figura 2.4: Estrutura química da surfactina.

Fonte: BARROS *et al.*; 2007.

Os surfactantes poliméricos são geralmente constituídos por heteropolissacarídeos que possuem proteína ou ácidos carboxílicos como no caso do emulsan (COOPER & PADDOCK, 1983). Na Figura 2.5 destaca-se a estrutura do emulsan, produzido pelo microorganismo *Acinetobacter calcoaceticus*, constituído por ácido graxo ligado a um grupo de heteropolissacarídeos.

Outros tipos de biosurfactantes são os ácidos graxos constituídos por proteínas hidrofóbicas, e os fosfolipídios formados por uma molécula de glicerol juntamente com dois ácidos graxos entre ligações de éster, e grupamento de fosfato (HORNICK, 2002).

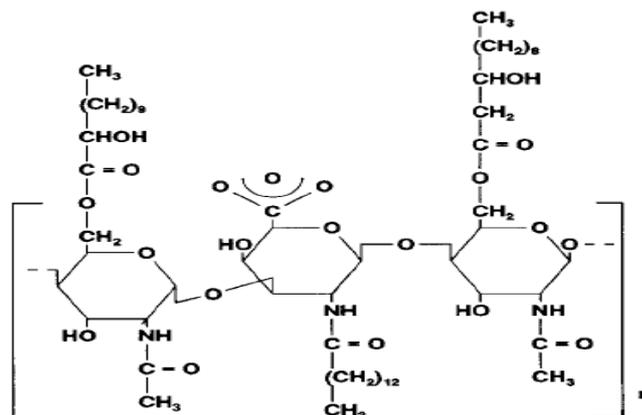


Figura 2.5: Estrutura química do emulsan, produzida por *Acinetobacter calcoaceticus*.
Fonte: DESAI & BANAT, 1997.

Devido essa variedade nos tipos de biossurfactantes foi observado que os mesmos possuem propriedades excepcionais, pois, demonstram diversas vantagens sobre os surfactantes químicos tais como baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, estabilidade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (APARNA *et al.*, 2012; WINTERBURN *et al.*, 2011).

2.1.3 Propriedades

Os biossurfactantes possuem propriedades relevantes para diversas áreas industriais, dentre as quais destacam-se: atividade superficial, biodegradabilidade, toxicidade baixa, capacidade emulsificante, e também adaptar-se em temperatura, pH e salinidade extremas (NITSCHKE & PASTORE, 2007; MUKHERJEE *et al.*, 2006). E devido essas moléculas serem tensoativas desempenham um importante papel na solubilização, na formação de espumas, em detergentes e na atividade antimicrobiana (FINNERTY, 1994).

As propriedades físico-químicas e bioquímicas da surfactina são: capacidade para reduzir a tensão superficial e interfacial, estabilidade quando submetida à temperatura, pH e concentrações de salinidade variadas, biodegradabilidade e atividade anti-microbiana. A seguir serão descritas em forma de tópicos as propriedades mais relevantes desse lipopeptídeo:

- Tensão superficial

As medidas de tensão superficial são um meio primordial para monitorar a produção dos biossurfactantes, e essas medidas são importantes, pois, demonstram o potencial de produção dos biossurfactantes. Porém, variáveis como: fonte de carbono, pH e meio de cultura influenciam no desenvolvimento e na produção do biossurfactante. No que se refere à produção do biossurfactante, o mesmo irá depender fortemente da quantidade da fonte de carbono e nitrogênio no caldo de cultura (BOGNOLO, 1999).

Na literatura existem diversos trabalhos relatando a diminuição da tensão superficial do microorganismo *Bacillus subtilis*, no qual os resultados são extremamente promissores, como por exemplo, na comparação da tensão superficial mínima para os surfactantes químicos conhecidos como SDS com valor de 28,6 mN / m e Pluronic F-68 com 42,8 mN / m (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008), enquanto, que para a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* o valor descrito é de 27,0 mN / m (PEYPOX *et al.*, 1999); *Bacillus subtilis* ATCC 21332 com 30,0 mN / m (WHANG *et al.*, 2008); *Bacillus subtilis* HSO121 com 30,03 mN / m (LIU *et al.*, 2009); *Bacillus subtilis* LSFM-05 com 29,5 mN / m (FARIA *et al.*, 2011).

- Temperatura, pH e salinidade

A surfactina em comparação com os surfactantes químicos possui vantagens únicas, como serem eficazes em variações de temperaturas, pH (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998), e salinidades em níveis baixos como por exemplo a 2% (CHEN *et al.*, 2012), 0 – 15% (LEE *et al.*, 2012) e 0,5% (KHAN *et al.*, 2011). Na Tabela 2.2, observa-se que o pH varia de 3 (ácido) a 10 (básico) e a temperatura de 30 a 120° C a depender do tipo de micro-organismo utilizado. Deve-se salientar a susceptibilidade a variações de temperatura e de pH destes micro-organismos produtores.

Tabela 2.2: Diferentes condições para adaptação dos *Bacillus*.

Micro-organismos	pH	Temperatura (° C)	Referência
<i>Bacillus sp</i> TKU004	> 7,0	37	CHEN <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	4,0 - 10,	80 - 120	AMANI <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus subtilis</i> CSY191	3,0	30- 37	LEE <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i> MI113	7,0	37	KHAN <i>et al.</i> , 2011

- Biodegradabilidade

A biodegradação é a capacidade que o biossurfactante possui em formar emulsões e solubilizar compostos imiscíveis em água, ou seja, o biossurfactante afeta a redução da tensão interfacial estabilizando a emulsão. E por este fato, a biodegradação é considerada uma forma ambientalmente aceitável de biodegradar resíduos, e geralmente são aplicados em casos de contaminação por óleos (CHRZANOWSKI *et al.*, 2012; CALVO *et al.*, 2009; BENTO *et al.*, 2005).

Em relação aos estudos utilizando a surfactina com o intuito de biodegradar, tem - se: a adição de surfactina em esgoto para avaliar sua biodegradação, no estudo grande parte do composto aromático e alifático foi degradado, obtendo o esgoto residual após o tratamento com cerca de 6,8 e 7,2% (MULLINAN, 2005); e na degradação do diesel com a adição de 40 mg/L de surfactina, obtendo-se um índice de remoção de 94% (WHANG *et al.*, 2008).

- Atividade antimicrobiana

Na literatura há trabalhos que relatam a utilização de surfactina com o intuito de aumentar a atividade antimicrobiana como no caso de JOE *et al.* (2012) e FERNANDES *et al.* (2007), o método utilizado para determinar a atividade antimicrobiana em ambos os trabalhos foi o método disco de difusão em ágar, utilizando papel filtro de 6 mm (N°1) embebido em uma suspensão de caldo de cultura contendo bactéria selecionada e o mesmo foi colocado sobre uma placa contendo ágar sólido e surfactina. A Tabela 2.3, demonstra a zona de inibição para alguns microorganismos, destacando a *Salmonella typhi* com maior zona de inibição e como menor Zona de inibição *Pseudomonas aeruginosa* CI 6.

Tabela 2.3: Relação da Zona de inibição para alguns microorganismos

Microorganismos	Zona de inibição (mm)
<i>Salmonella typhi</i>	36,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	32,3
<i>Staphilococcus aureus</i>	29,3
<i>Enterococcus faecalis</i> CI 068	17,40 ± 0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CI 6	10,5 ± 0,1

Fonte: Adaptado de JOE *et al.* (2012) e FERNADES *et al.* (2007).

A inibição de crescimento de *Listeria monocytogenes* em poliestireno foi relatada observando que no caso da *Listeria monocytogenes* 7644 obteve-se uma redução de aderência de 84 % para a surfactina e já no caso do rhamnolípido a redução maior ocorreu com a *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 em torno de 82% (ARAUJO *et al.*, 2011).

Verificou-se a influência do *Bacillus subtilis* 20B na inibição de crescimento dos fungos *Chrysosporium indicum*, *Alternaria burnsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium udum*, *Trichoderma herzanium* e *Rhizoctonia bataticola* obtendo redução do crescimento desses microorganismos (JOSHI *et al.*, 2008).

Portanto, o interesse pelos biossurfactantes estão baseados em suas diversas propriedades funcionais, tornando esses compostos interessantes para aplicações em diversas áreas, como em processos de recuperação ambiental tal como a biorremediação, biofilmes (ARAUJO *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2009), dentre outros.

2.1.4 Aplicação

Os biossurfactantes são úteis em várias aplicações, isso decorre devido sua à ação específica, sua toxicidade e seu modo de preparação, tornando a sua aplicação bem diversificada (NITSCHKE & PASTORE, 2002) . A seguir a Tabela 2.4, destaca as aplicações dos biossurfactantes.

Tabela 2.4: Aplicações dos biossurfactantes.

Aplicações	Referência
Petroquímica	LIMA & ALEGRETE, 2009
Alimentos	
Cosméticos	
Biorremediação	NITSCHKE & PASTORE, 2002
Indústria Farmacêutica	SINGH <i>et al.</i> , 2007
Indústria Metalúrgica	BORDOLOI & KONWAR, 2008
Recuperação avançada de petróleo(MEOR)	
Indústria de mineração	KOSARIC <i>et al.</i> , 1987
Agro-Indústria	FINNERT,1994

No caso da aplicação da surfactina, as moléculas apresentam um espectro relevante devido à sua atividade biológica, tornando bem mais atraente para diversas aplicações

industriais e acadêmicas, contendo grandes quantidades de micelas e um número de agregações em torno de 173, e uma concentração micelar crítica de aproximadamente $9,4 \times 10^{-6}$ M, facilitando assim a adsorção na interface gás - líquido (PEYPOUX *et al.*, 1999; GRAU *et al.*, 1999; ISHIGAMI, 1995).

Características químicas tais como detergência, capacidade espumante, solubilização, formação de emulsões estáveis, agentes preventivos a algumas doenças, diminuição da tensão superficial e lidar bem com pH extremos fazem com que a surfactina possua diversas aplicações (BARROS *et al.*, 2007; LANG, 2002).

No entanto há poucos estudos que se referem à aplicação de surfactina no setor industrial, embora, suas propriedades sejam significativas a este setor, podendo ser empregado em biodegradação de hidrocarbonetos, diesel, recuperação melhora de petróleo (MEOR), indústria de alimentos como na panificação, em compostos aromáticos, na indústria de leite, em biofilmes (WHANG, 2008; BARROS *et al.*, 2007; CUBBITO *et al.*, 2004; PRICE *et al.*, 1993), e também, como agente antitumoral, anti- inflamatória e antiviral (PARK & KIM, 2009; PEYPOX *et al.*, 1999). Devido a essas diversas possíveis aplicações, começa-se a desenvolver mais estudos referentes a essa aplicabilidade na área industrial (BARROS *et al.*, 2007; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Segundo GOMES & NITSCHKE (2012), na área alimentar destaca-se o uso da surfactina para produção de biofilmes tendo como finalidade reduzir a aderência de microorganismos patogênicos na área superficial de alimentos sólidos, no entanto, nota-se que a aderência dependera dos microorganismos patogênicos assim como a concentração da surfactina utilizada como biofilme, utilizando-se uma concentração de 0, 25% de surfactina reduziu-se em 42% a aderência de microrganismos tais como *Listeria monocitogenes* e *S. Enteritidis*.

Na área de saúde, a surfactina tem apresentado capacidade para inibir a disseminação e induzir apoptose em células cancerígena, observada em estudos que envolvem mamas humanas tendo como resultado atividade anticancerígena com aumento de atividade de 20,3 % para 54, 7% (LEE, 2012; CAO, 2010; KIM, 2007).

Com todas essas aplicações, a surfactina é um dos biosurfactantes mais poderosos e muito promissor para utilização em indústrias petrolíferas, farmacêuticas dentre outras, é uma forma para separar / recuperar esse biosurfactante pode ser por meio da adsorção desse biosurfactante na interface gás – líquido (PLOCINICZAK *et al.*, 2011; VANHOUTE *et al.*, 2008).

2.2 Adsorção de tensoativos na interface gás – líquido

Em meados da década de 70 surgiram pesquisas significativas quanto à adsorção, ressaltando que somente na década de 90 o avanço foi maior devido à descoberta de novos materiais tais como moléculas de carbono e novos processos de adsorção (DO, 1998).

E tendo em vista, que a adsorção permite a recuperação / concentração de compostos a partir de soluções diluídas, é notável, que a adsorção seja atraente, devido sua fácil operação e alta capacidade, porém a capacidade de adsorção irá depender fortemente das propriedades do adsorvente, do adsorvido, das condições da solução assim como das suas interações (SOTO *et al.*, 2011).

A adsorção de biossurfactantes na interface gás líquido pode ocorrer por diversas formas como, por exemplo, aeração ocasionando à transferência do gás para o líquido com a criação de uma interface gás-líquido; uso de membrana semipermeável para dissolução do gás no líquido com a formação de uma interface; por meio de um agitador ou turbina; de materiais cerâmicos porosos sinterizados ou membranas poliméricas perfuradas (ROSSO *et al.*, 2006).

E devido aos compostos tensoativos possuírem uma natureza anfifílica, conseqüentemente apresentam uma porção hidrofóbica e hidrofílica, resultando no acúmulo da interface gás – líquido, e esse acúmulo provoca a redução da tensão superficial, e notando-se que a diminuição da tensão interfacial irá depender da concentração do surfactante até atingir a concentração micelar crítica (LINKE & BERGER, 2011; ROSSO *et al.*, 2006; ADAMSOM, 1990).

Uma vez que no equilíbrio, as tensões interfaciais estão relacionadas com as concentrações de superfícies, através da Lei de adsorção de Gibbs, a equação mais importante na ciência interfacial (MILLER *et al.*, 2004).

2.3 Lei de adsorção de Gibbs

Segundo KARGER & DeVIVO (1968) em condições de equilíbrio de adsorção, as substâncias químicas presentes em soluções e adsorvidas na interface gás-líquido podem ser descrita pela equação de Gibbs, propondo que a interface poderia apresentar-se matematicamente em um plano divisório, no qual o excesso da superfície do solvente fosse nulo (ADAMSOM, 1990).

A interface que ocorre entre duas fases não pode ser visualizada por um plano divisório e sim pela região onde ocorre variação das propriedades de uma fase para outra

(ADAMSON, 1990), conforme pode ser observado na Figura 2.6. Porém a utilização da Lei de Gibbs para determinação da concentração dos componentes na região interfacial é muito simples e direto (MYERS, 1999).

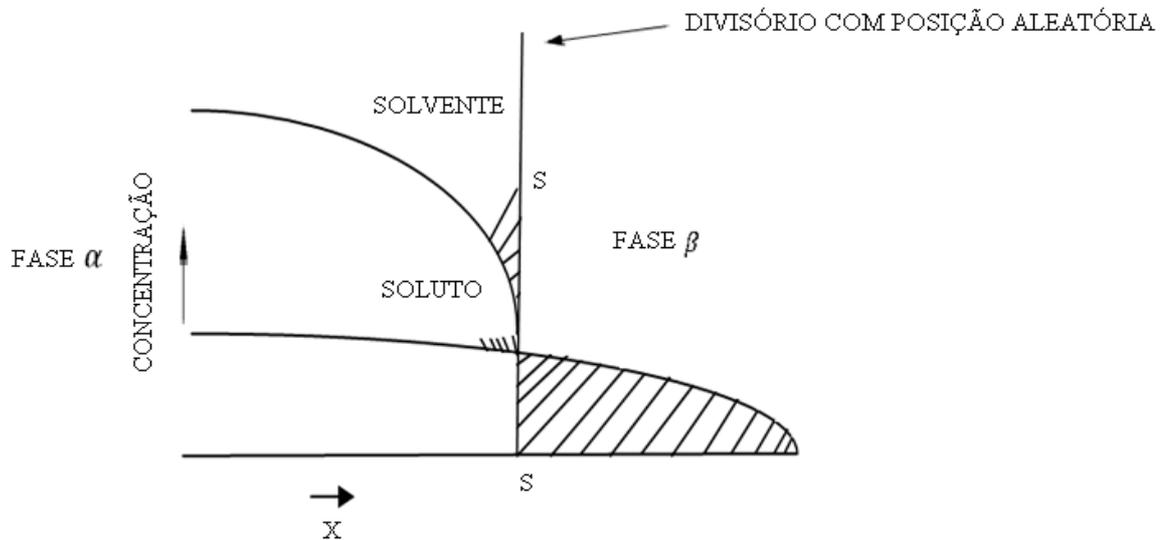


Figura 2.6: Concentração do solvente e soluto na interface de duas fases.
 Fonte: Adaptado de ADAMSON, 1990.

De acordo com FLOORENCE & ATTWOOD (2003) existe um equilíbrio entre as moléculas de tensoativos na superfície e na interface e remanescente na solução e esse equilíbrio são expressos por:

$$d\mu = dq_{\text{rev}} - dW \quad (1)$$

Onde: q_{red} é o calor absorvido e W será o trabalho realizado durante a mudança reversível.

Para soluções diluídas tem-se a extensão matemática para Lei de Gibbs:

$$\Gamma = - \frac{1}{RT} \frac{dy}{d \ln c} \quad (2)$$

Onde: Γ é a concentração superficial em excesso;

R é a Constante universal dos gases (dina cm/mol K);

T é a temperatura absoluta (K);

Y é a tensão superficial (dina/cm);

C é a concentração do soluto no seio líquido (moles/cm³).

Ressalta-se que a utilização da equação de Gibbs para a adsorção interfacial é limitada por faixas de concentrações onde ocorre somente a formação de monocamadas, ou seja, verificando o comportamento da tensão superficial ($\ln C_b$) em um determinado valor de C_b quase não existe modificações nas tensões superficiais (CHARM *et al.*, 1966). No caso de concentrações mais baixas é possível observar que diversas faixas de concentrações superficiais permanecem constantes, e esse comportamento de Γ com C_b é válido até a saturação de monocamadas (LUCENA, 1995), conforme Figura 2..

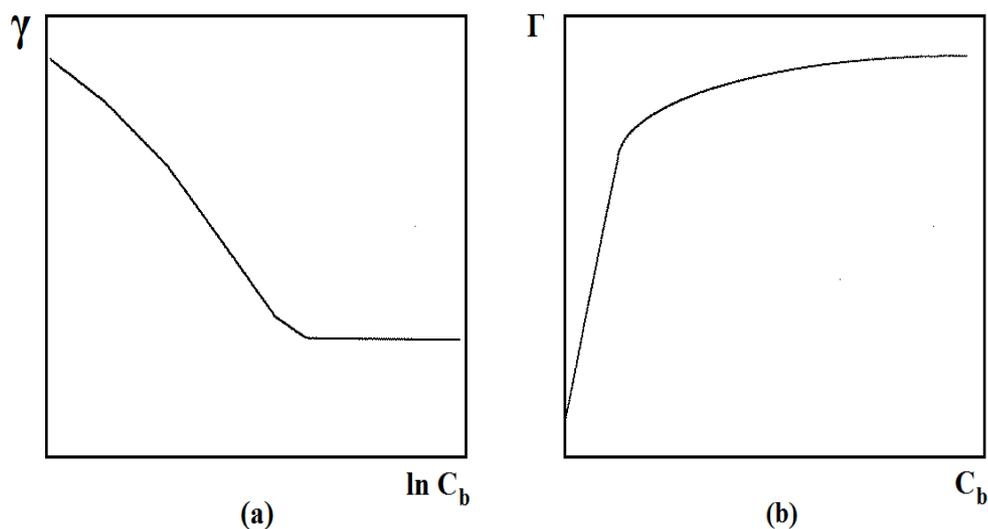


Figura 2.7 - (a) Comportamento típico da tensão superficial com a concentração para soluções de moléculas com atividade superficial. (b) Comportamento de Γ com C (isoterma de adsorção).

Fonte: LUCENA, 1995.

E por tanto, ressaltar - se que a Lei de adsorção de Gibbs pode ser determinada pela isoterma de adsorção por Langmuir para valores de concentração que contenham somente uma camada de adsorção na interface gás – líquido (DOUILLARD *et al.*, 1993).

2.4 Isoterma de adsorção por Langmuir

O primeiro autor a propor uma teoria eficaz de adsorção em uma superfície plana com base do ponto de vista cinético foi Langmuir em 1918, com o uso de um processo contínuo de bombeamento de moléculas numa superfície e uma correspondente dessorção de moléculas até seu equilíbrio. O modelo de Langmuir possui características como: a superfície ser homogênea, adsorção na superfície ser localizada e cada local pode conter apenas uma molécula ou átomo (DO, 1998).

A equação que se refere ao modelo para isoterma de adsorção de Langmuir para interface gás-líquido é dada por:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\text{máx}} \cdot C_b}{K_d + C_b} \quad (3)$$

Onde: C_b é a concentração de tensoativo;

K_d é a constante de equilíbrio;

Γ e $\Gamma_{\text{máx}}$ são a concentração e concentração máxima de tensoativo na interface gás-líquido.

2.5 Espumas

As espumas são sistemas termodinamicamente instáveis que exibem um arranjo tridimensional composta de células gasosas compreendidas em um filme líquido contínuo. E essa instabilidade da espuma pode se ocasionada por três diferentes processos como: 1- drenagem do líquido contido na espuma por meio da ação da gravidade e das forças capilares, 2 – coalescência decorrente da fusão de duas bolhas causando a ruptura da película entre essas bolhas, e 3 – desproporcionamento entre as bolhas de gás. O processo de ruptura da bolha pode ocorrer naturalmente em qualquer espuma sem nenhuma intervenção externa, porém, dependendo do fator externo esse processo pode ser acelerado como no caso de uma queda de pressão na fase líquida da espuma que acarreta um aumento na taxa de drenagem ou a ruptura dos filmes que são estáveis quando não aplicada uma pressão (FIGUEREDO *et al.*, 1999; BISPERINK *et al.*, 1992).

As espumas são caracterizadas por não se formar através de líquidos puros; serem instáveis termodinamicamente; as propriedades reológicas da interface e a interação entre as interfaces da espuma serem de grande importância para sua estabilidade; e sua estabilidade e formação poder depender de um agente tensoativo, embora possam ser estabilizada por nanopartículas sem a necessidade de um tensoativo (MALYSA *et al.*, 1992)

Para formação de espumas as bolhas de gás são introduzidas em uma solução, e essa introdução é diversificada podendo ocorrer por borbulhamento; agitação; uso de produtos químicos que causam uma reação dentre outros. Esses métodos para formação de espuma possuem dois princípios básicos como: aprisionamento de bolhas de gás do líquido e introdução de bolhas de gás por meios físicos ou químicos (KARAKASHEV & GROZDANOVA, 2012).

As geometrias visualizadas nas bolhas de espuma podem ser de forma poliédrica ou esférica. Na forma esférica existem filmes líquidos espessos, visualizados no desenvolvimento da espuma. Logo após a drenagem do líquido, os filmes afinam-se e assumem uma formação poliédrica. A organização das bolhas é formada por três ou quatro linhas adjacentes e quando acontece à ruptura do filme da espuma as bolhas reorganizam-se, e essa capacidade de organização decorre de uma força contrária resultante do efeito do efeito da elasticidade de GIBBS e da elasticidade de Marangoni conhecido como Efeitos de Gibbs-Marangoni. O líquido contido na espuma é formado por duas regiões: nos filmes e no canal de Plateau formado pelo encontro dos filmes (FIGUEREDO *et al.*, 1999; WASAN *et al.*, 1992). A seguir a Figura 2.8 destaca tal organização.

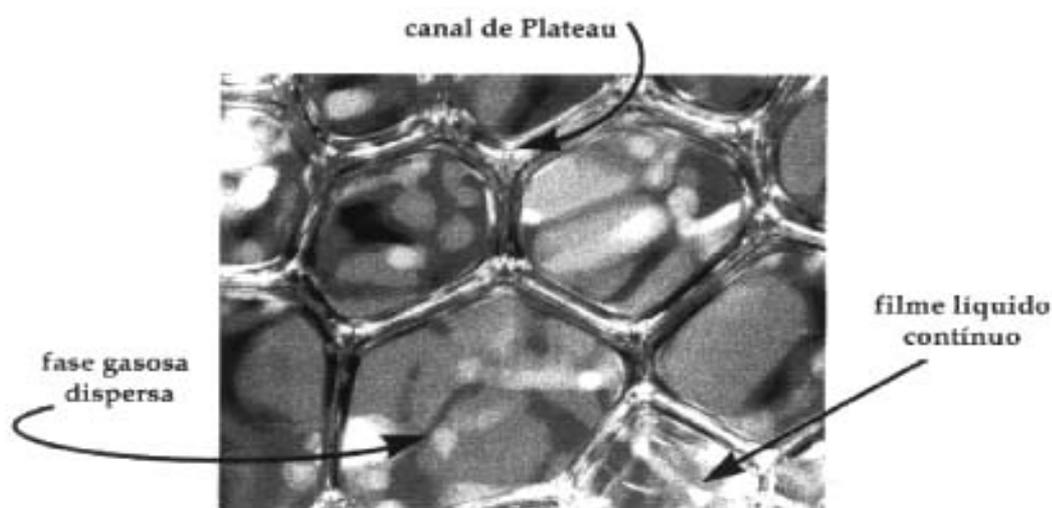


Figura 2.8: Estrutura de uma espuma constituída por uma fase gasosa e uma fase líquida (Filmes e canais de Plateau).

Fonte: FIGUEREDO *et al.*, 1999.

Em colunas de espuma, as taxas de drenagem possuem uma relação significativa com a velocidade superficial do gás, ou seja, maiores velocidades diminuem a drenagem e conseqüentemente diminuem o enriquecimento do produto no topo e vice-versa (LUCENA, 1995). A destruição de uma coluna de espuma começa a partir das camadas superiores, uma vez que se liberta mais rápido que o líquido (excesso) e os filmes de espuma chegam mais rápido ao equilíbrio, ou seja, essa diminuição do volume da espuma ocorre gradualmente de camada para camada ou por destruição simultânea da espuma.

No entanto, os processos para concentração / recuperação das biomoléculas são essenciais não só como uma ferramenta de investigação, mas também para aplicações industriais, e esses processos podem ser por processos de separação de espuma por meio de fracionamento de espumas, ou por flotações (NAKABAYASHI *et al.*, 2011; SOTO *et al.*, 2011) dentre outros.

2.6 Processos de Separação

2.6.1 Separação por espuma

O fracionamento com espumas é uma técnica de baixo custo operacional, eficiente na separação/concentração de agentes tensoativos a partir de caldo fermentado e/ou soluções diluídas (DARTON *et al.*, 2004; SANTANA, 2003; SALEH & HOSSAIN, 2001).

No fracionamento com espumas, diferentes fluxos que ocorrem na coluna de espuma podem ser observados (Figura 2.9), isso decorre do fluxo causado pelo arraste do líquido pelo gás introduzido para formação das bolhas e também pela drenagem do líquido intersticial oriundo das bolhas influenciado pela gravidade e pelas forças capilares que provocam um refluxo. Além dos fatores anteriormente citados que influenciam na recuperação e enriquecimento, outros parâmetros como: pH; concentração inicial da agente tensoativo; velocidade superficial do gás; altura da coluna de líquido e da espuma envolvidos durante o processo, resultam na depleção do surfactante no líquido (BURGHOFF, 2012; MERZ *et al.*, 2011, SANTANA, 2003).

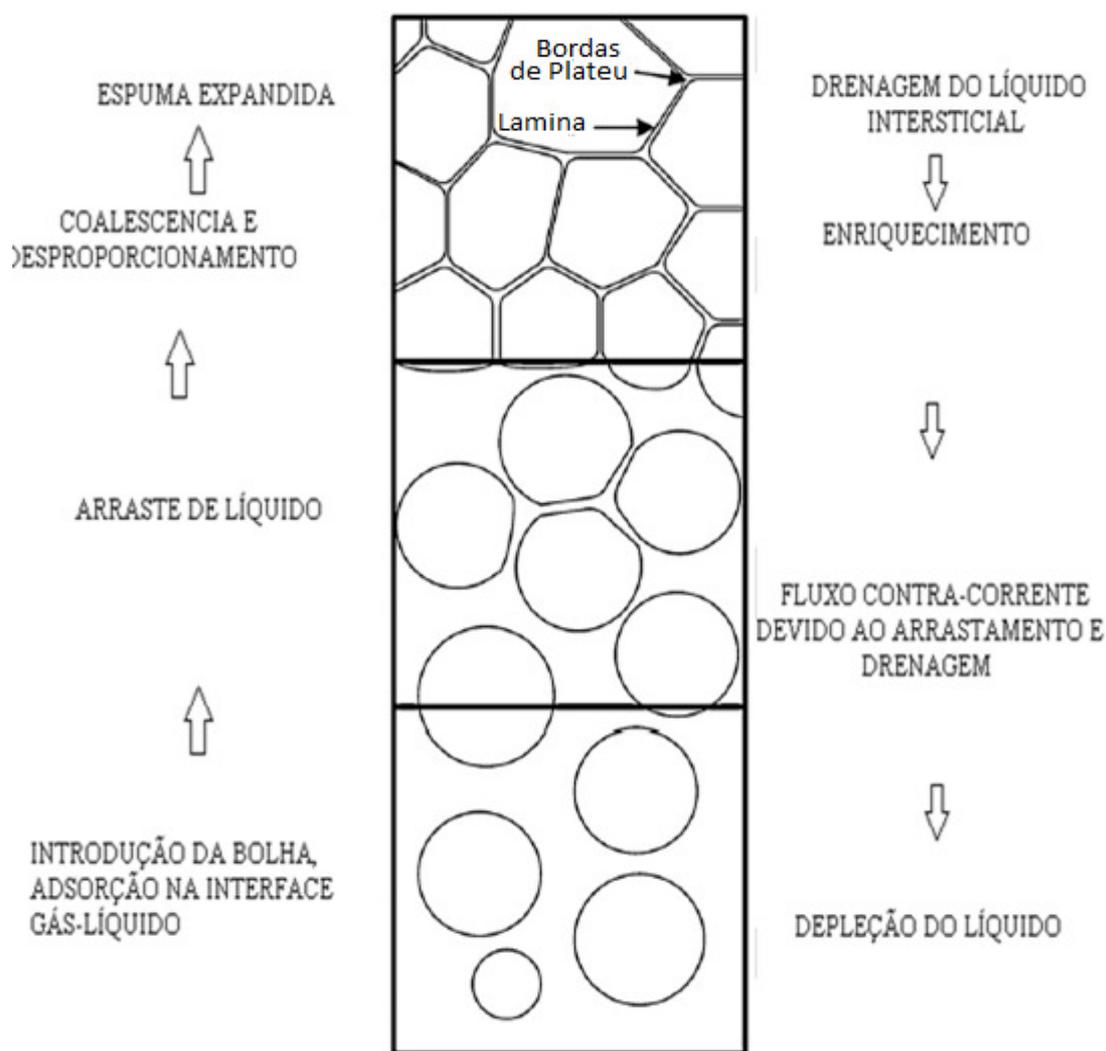


Figura 2.9: Diferentes efeitos durante formação e estabilização da espuma.

Fonte: Adaptado de BURGHOFF, 2012.

O mecanismo para fracionamento de espumas é baseado na introdução de gás em placas porosas ou perfuradas com o intuito de gerar bolhas de gás, onde ocorreria a adsorção do tensoativo na interface gás-líquido dessas bolhas de gás, essas bolhas sobem axialmente para o topo da coluna gerando assim a espuma que pode ser fisicamente separado da fase líquida para remoção do tensoativo e qualquer outro soluto, a uma concentração maior do que a encontrada na parte líquida, ou seja, os surfactantes são preferencialmente adsorvidos na interface gás-líquido (RUJIRAWANICH *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2011; DICKINSON *et al.*, 2010). Na Figura 2.10, pode-se observar o processo de fracionamento da espuma, onde nota-se que após a espuma gerada, os solutos (tensoativos) são adsorvidos na interface gás-líquido e a outra parte não adsorvida permanece no espaço intersticial.

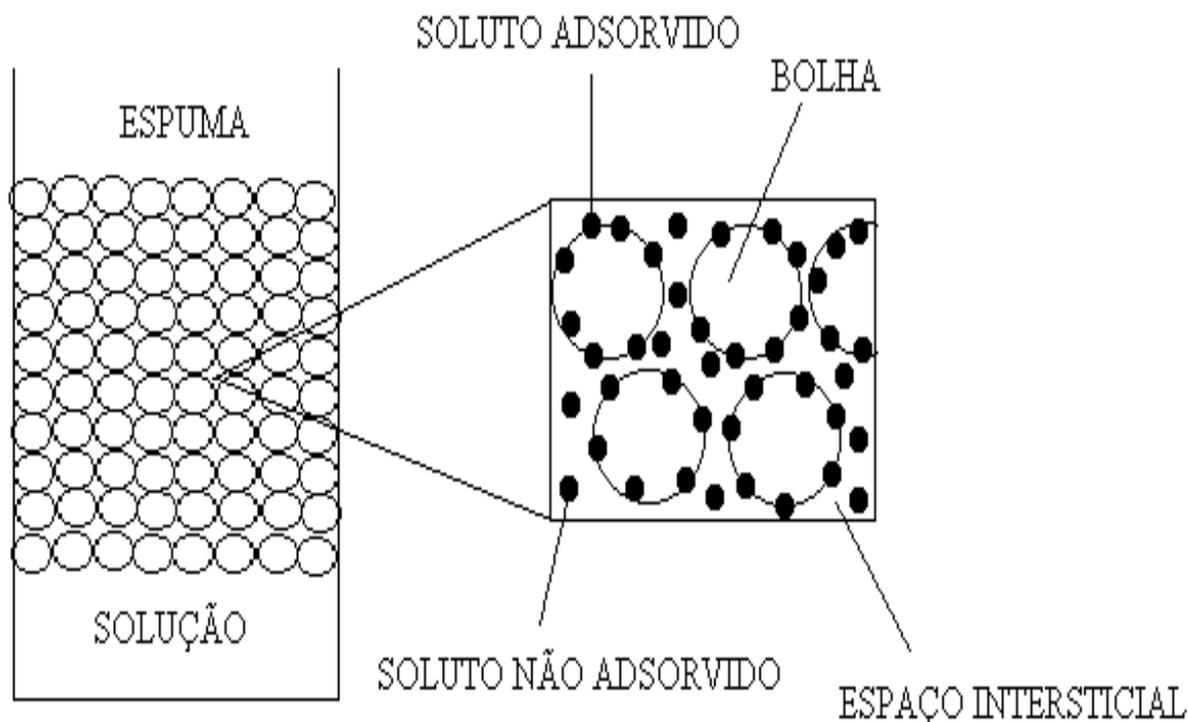


Figura 2. 10: Fenômeno ocorrido durante o fracionamento da espuma
Fonte: Adaptado de QU *et al.*, 2008.

Diversos trabalhos relatam o uso de fracionamento com espumas tais como: na concentração de biossurfactantes (SARACHAT *et al.*, 2010); remoção de matérias de partículas orgânicas em soluções diluídas (BARRUT *et al.*, 2012; MARUYAMA *et al.*, 2007); separação de proteínas (NAKABAYASHI *et al.*, 2011; BHATTACHARJEE *et al.*, 1997); extração de metais, de fitonutrientes, metabólicos (MERZ *et al.*, 2011) entre outros.

2.6.2 Separação por bolhas

De acordo com THOMAS & WINKLER (1977) e VALSARAJ *et al.*, (1991) o método que utiliza interface gás-líquido envolvendo bolhas de gás são descritos como separação por adsorção em bolhas é são sub-dividido em dois grupos, conforme Figura 2.11 O primeiro grupo é caracterizado pela separação com espuma, e formado pelo fracionamento com espuma e pela flotação e suas ramificações, e o segundo grupo é constituído pela separação por adsorção em bolhas sem a formação de espuma e composto por subflotação e pelo fracionamento com bolhas.



Figura 2.11: Esquema da classificação dos métodos de separação envolvendo o fenômeno de adsorção em bolhas

Fonte: Adaptado de THOMAS & WINKLER, 1977.

No processo de fracionamento com bolhas, o transporte do agente tensoativo ocorre na superfície da bolha devido à adsorção na interface gás-líquido, o qual rompem-se na parte

superior da coluna liberando o material adsorvido do qual pode ser recuperado, resultando assim em uma concentração de surfactante que aumenta com a altura (CHEN, 1994; FIELDS *et al.*, 1983; LEMLICH, 1972).

Na sublatação com solvente, o processo é basicamente parecido com o fracionamento com bolhas, o diferencial é a presença de uma camada de líquido imiscível na parte superior da coluna de líquido, ou seja, o material adsorvido na superfície das bolhas de gás fica retido nessa camada (CLARKE & WILSON, 1983; LEMLICH, 1972). Existem diversos trabalhos relacionados com o processo de sublatação com solvente, dentre os quais: CLARKE & WILSON (1983) e LEMLICH (1972) relatando vários estudos envolvendo esse processo; e CARAGAY & KARGER (1966) na remoção de corantes metil-orange e rodamina B e 2-octanol como camada imiscível. A seguir a Figura 2.12, demonstra o esquema do aparato utilizado para sublatação com solvente, onde a parte superior (Líquido enriquecido) contém uma camada de líquido imiscível que retém o material adsorvido, enquanto na parte inferior a fase líquida esta empobrecido.

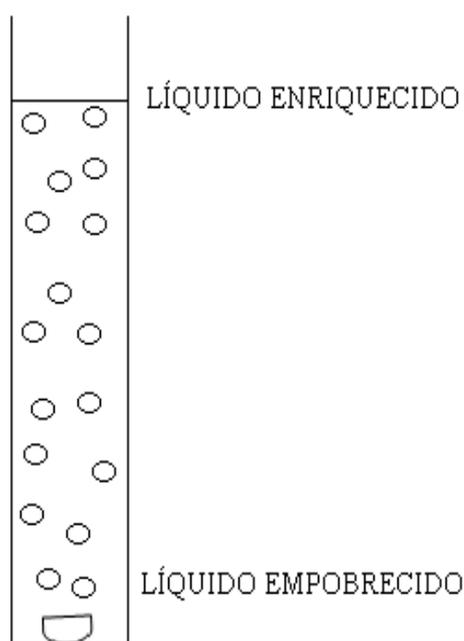


Figura 2.12: Esquema do aparato.

Fonte: Adaptado CLARKE & WILSON, 1983.

Na flotação e no fracionamento com espuma, o acumulo de tensoativos é encontrado na espuma, este fato é causado devido à adsorção do tensoativo nas bolhas de gás, que ao

passarem pela coluna de líquido formam uma coluna de espuma e/ou leito de espuma que quando colapsada, libera o material adsorvido (KRUGLYAKOV, 2010; LEMLICH, 1972).

Ressaltando-se que o fracionamento com espuma é uma técnica que visa a separação / concentração de espécies de superfícies ativa em soluções diluídas (VO *et al.*, 2011) ao contrário da flotação que visa as partículas em suspensão para separação/concentração (THOMAS & WINKLER, 1977). Estudos referentes ao processo de fracionamento de espuma são muito relatados na literatura, como na separação da albumina (OSTWALD & SIERH, 1937), separação de renina da pepsina (ANDREWS & SCHULTZ, 1945), fracionamento de BSA (SCHNEPF & GADEN, 1959), fracionamento de surfactina (CHEN *et al.*, 2006; DAVIS *et al.*, 2001), durante o período de 1970-1974 cerca de 200 estudos foram realizados, dos quais se baseavam no fracionamento de espuma, flotações de íons, flotação precipitativa e flotações coloidais descritos por GRIEVES (1975).

Contudo, a técnica de fracionamento com espuma pode basicamente proporcionar tanto uma eficiência de recuperação como um enriquecimento elevado de biossurfactantes (SARACHAT *et al.*, 2010).

2.7 Recuperação e enriquecimento da surfactina em coluna de fracionamento via espuma

Na literatura existem poucos trabalhos direcionados a recuperação e enriquecimento de surfactina em colunas de fracionamento via espuma, porém trabalhos como o de DAVIS *et al.*, (2001) são promissores, pois, descrevem o desenvolvimento de duas técnicas para obtenção da recuperação da surfactina. A primeira técnica utiliza um sistema não integrado, ou seja, pelo modo semi - batelada para recuperação da surfactina oriunda da espuma com a utilização de uma coluna de bolhas e espuma com dimensão de 30 cm, condições operacionais de vazão a 60 mL/min, temperatura de 25° C e concentração de surfactina de 440 mg/L, utilizando um caldo contendo células. E a segunda técnica utiliza o caldo isento de células do qual é removido por centrifugação. No caldo contendo células obteve-se um enriquecimento variando entre 1,2 à 8,4 vezes e recuperação de 97,3%, enquanto, que no isento de células a recuperação foi de 97,1% e enriquecimento de 2,3 até 51,6 vezes. Na Figura 2.13, destaca-se as partes que constituem o sistema não integrado para obtenção de espuma, o processo dá-se pela injeção de gás, que adentra em um frasco contendo água destilada para umidificação do mesmo, para assim promover o borbulhamento do caldo contido na coluna e posterior

formação de uma coluna de espumas que será direcionada axialmente até um coletor de espumas para posteriores análises da mesma.

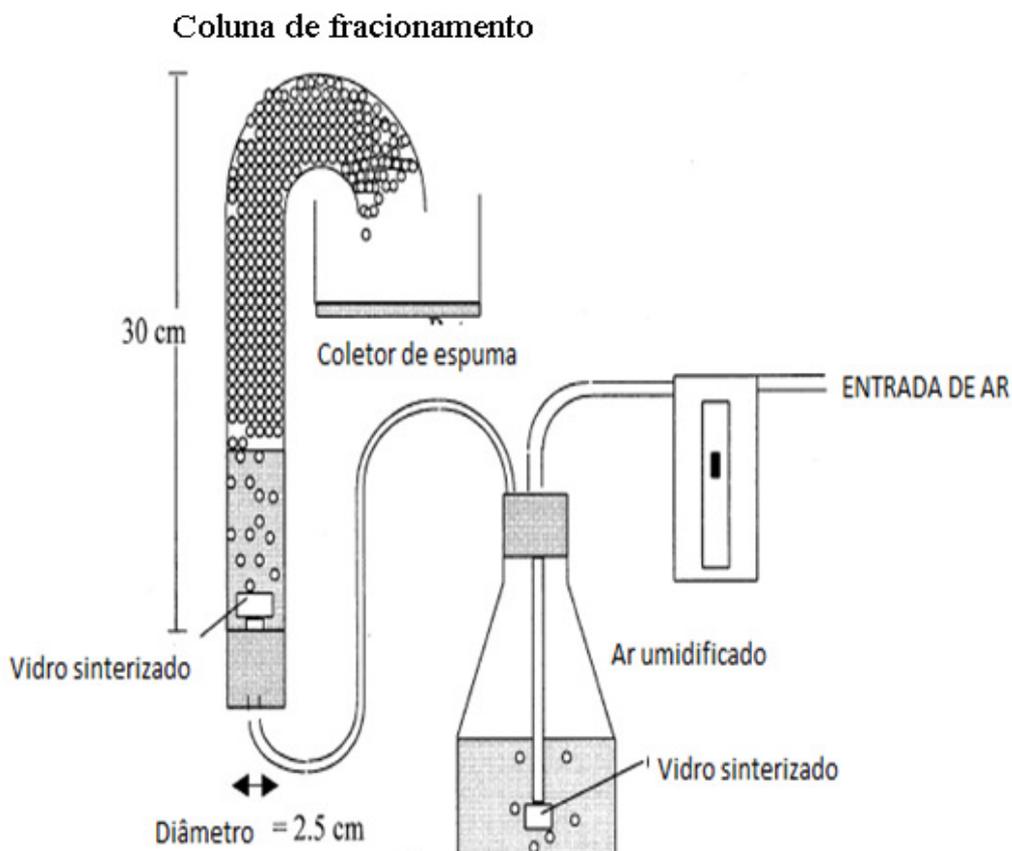


Figura 2.13: Aparato utilizado para fracionamento de espuma no modo semi-batelada.
Fonte: Adaptado de DAVIS *et al.*, 2001.

Na segunda parte utilizou-se um sistema integrado com o auxílio de uma coluna acoplada a um biorreator. Nesse estudo foi avaliado a velocidade de agitação no caldo contido no biorreator, para as velocidades de agitação de 146 e 166 rpm teve-se uma recuperação de 64,4% e 71,4% respectivamente e enriquecimento de 60 vezes para ambos. Na Figura 2.14 a seguir, pode ser observado o aparato utilizado para o processo de produção e coleta de espuma.

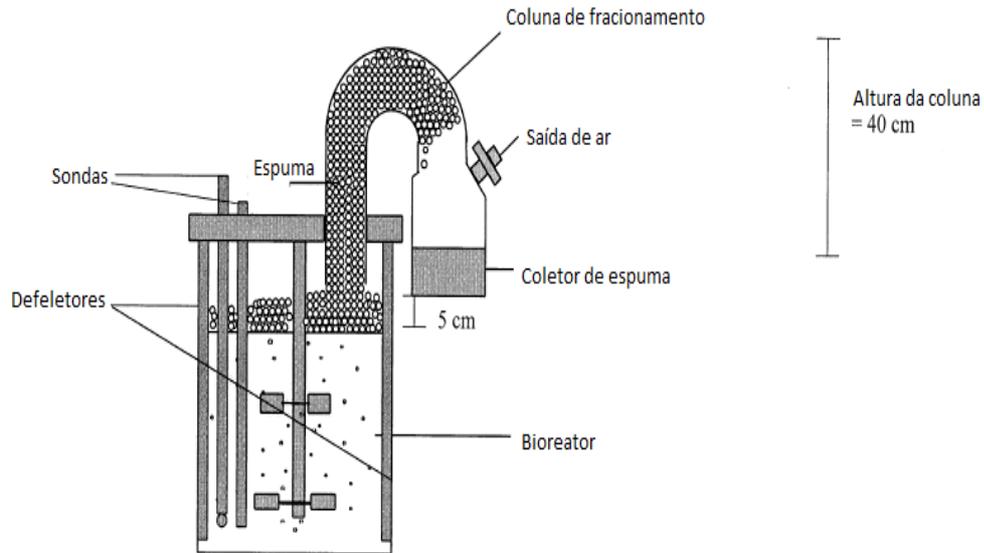


Figura 2. 14: Aparato utilizado para produção de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e coleta da espuma.

Fonte: Adaptado de DAVIS *et al.*, 2001.

Trabalhos como o de CHEN *et al.*, 2006, demonstraram uma recuperação de surfactina de 92,3%, nesse experimento uso-se uma cepa de *Bacillus subtilis* BBK 006 para obtenção da surfactina e o equipamento necessário para tal processo foi um biorreator (método em batelada), já no trabalho de MONTASTRUC *et al.*, (2011) a recuperação da surfactina foi na ordem de 94% com o uso de um biorreator, sendo que a espuma gerada foi eluída em metanol.

Portanto, verificou-se através da revisão bibliográfica no que se refere à recuperação e enriquecimento da surfactina em coluna de fracionamento via espuma em um sistema simples, a escassez de trabalhos que vissem as variações dos parâmetros de vazões superficiais de gás, temperatura de operação da coluna de fracionamento e concentração inicial de solução de surfactina. O único trabalho citado o de Davis *et al.* (2001) utiliza somente a vazão superficial do gás a 60 mL/min, temperatura de 25° C e concentração de surfactina em 440 mg/L. Além de diferenciar-se na utilização do microorganismo e nas dimensões da coluna de fracionamento.

Visando a otimização do processo de fracionamento em coluna de bolhas espuma no presente trabalho, foi realizado um planejamento estatístico 2^3 , com 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios experimentais, com condições operacionais de vazão superficial do gás à 20, 40 ou 60 mL/min, temperatura de 15, 25 ou 35° C e concentração inicial de surfactina à 266,6, 425 ou 569,7 mg/L, podendo-se assim avaliar a influencia desses parâmetros na recuperação e enriquecimento da surfactina em coluna de fracionamento.

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos empregados no desenvolvimento do estudo da concentração da surfactina obtido pelo *Bacillus sp* ITP 001 para fracionamento em coluna de bolhas e espuma e a surfactina padrão *Bacillus subtilis* para obtenção da curva analítica. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Alimentos (LPA), no Núcleo de Estudos de Sistemas Coloidais (NUESC) ambos pertencentes ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes (UNIT) e no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

3.1 Surfactinas utilizadas

As surfactinas utilizadas nos experimentos foram obtidas de duas fontes distintas: (1) surfactina padrão de *Bacillus subtilis*, lote 090M4036, massa molar 1036 g/mol, com pureza de $\geq 98\%$ (HPLC e TLC), adquirida da Sigma - Aldrich Brasil Ltda, produto § 3523, para obtenção da curva analítica; e (2) surfactina semipurificada (isenção de células), produzida por *Bacillus sp* ITP 001 no Laboratório de Pesquisa de Alimentos (LPA/ITP/UNIT) para o fracionamento em coluna de bolhas e espuma da surfactina.

3.2 Produção de surfactina por *Bacillus sp* ITP 001

A fermentação foi realizada em frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura com composição descrita na Tabela 3.1. O meio foi esterilizado em autoclave (Marconi) a uma temperatura de 121° C por 15 minutos. O frasco foi inoculado com 10% de volume de inóculo com 48 horas de idade e em seguida colocado no Shaker (Tecnal – TE 422) com temperatura e rotação controlada durante 120 horas de fermentação. Na Figura 3.1, é demonstrado as etapas para produção do biossurfactante.

Tabela 3.1 Meio de cultura

Meio de Cultura	Composição (% m/v)
Amido solúvel (Synth, USA)	10,0
Extrato de levedura (Himedia, Índia)	3,0
KH ₂ PO ₄ (Quimis, Brasil)	0,5
NaNO ₃ (Vetec, Brasil)	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (Vetec, Brasil)	0,25
Peptona bacteriológica (Himedia, Índia)	0,65

Fonte: FEITOSA *et al.*, 2010.

3.3 Fracionamento da surfactina

A surfactina foi produzida durante a fermentação da bactéria *Bacillus sp* ITP 001. Após 120 h, o caldo foi primeiramente centrifugado para a remoção das células microbianas, e para realização dos experimentos, a fermentação foi diluída com água deionizada. O pH das soluções foi medido em pHmetro (Marconi) e corrigido, quando necessário, para pH 7,0 pela adição de NaOH ou HCl.

O planejamento de experimentos utilizado para verificar a recuperação média ($R_M\%$) e o enriquecimento médio (E_M) da surfactina obtida via espuma foi um fatorial 2^3 , com três repetições no ponto central, no qual foram avaliadas a vazão do gás nitrogênio (20, 40 ou 60 mL/min), a concentração inicial da surfactina da solução (266,6, 415 ou 569,7 mg/L) e a temperatura (15, 25 ou 35° C), avaliadas em três níveis como mostra a Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Variáveis avaliadas com seus respectivos níveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 .

Variáveis		Níveis Reais		
Vazão volumétrica (mL/min)	X ₁	20	40	60
Concentração inicial (mg/L)	X ₂	266,6	425,0	569,7
Temperatura(° C)	X ₃	15	25	35

Os ensaios foram realizados de modo aleatório na coluna de fracionamento, dispostos na matriz do planejamento fatorial (Tabela 3.3). Pelo planejamento dos experimentos, obtiveram-se os resultados médios de recuperação ($R_M\%$) e enriquecimento médio (E_M) da surfactina em toda a corrida experimental no processo de fracionamento em coluna de bolhas e espuma por meio das combinações das variáveis. E a partir desses valores foi possível avaliar os efeitos da vazão, concentração e temperatura sobre a resposta, e assim

determinar estatisticamente as variáveis significantes no processo de fracionamento da surfactina.

Tabela 3.3: Matriz do planejamento fatorial 2^3 empregadas no estudo da recuperação média ($R_M\%$) e enriquecimento médio (E_M) do biosurfactante.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ (mL/min)	X ₂ (mg/L)	X ₃ (°C)
1	-1	-1	-1	20	266,6	15
2	1	-1	-1	60	266,6	15
3	-1	1	-1	20	569,7	15
4	1	1	-1	60	569,7	15
5	-1	-1	1	20	266,6	35
6	1	-1	1	60	266,6	35
7	-1	1	1	20	569,7	35
8	1	1	1	60	569,7	35
9	0	0	0	40	425	25
10	0	0	0	40	425	25
11	0	0	0	40	425	25

Dados: X₁: VAZÃO VOLUMÉTRICA DO GÁS (mL/min)
X₂: CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SURFACTINA (mg/L)
X₃: TEMPERATURA (°C)

3.4 Aparato experimental

Para o fracionamento em coluna de bolhas e espuma o aparato principal utilizado para realização dos experimentos foi uma coluna de vidro medindo 110 cm de altura e com diâmetro interno de 3,2 cm, na qual foi adicionado o caldo fermentado na extremidade superior da coluna usando um funil de decantação.

A coluna de vidro ficou posicionada verticalmente em uma grade presa por 3 ganchos ao longo de toda coluna, a mesma possuía uma jaqueta térmica acoplada ao longo de todo seu comprimento, com a finalidade de permitir a circulação de água a uma dada temperatura definida e controlada por um banho termostático (Julabo Labortechnik, Germany).

Na extremidade inferior da coluna, localizava-se um canalito no qual foi introduzida uma vazão de gás nitrogênio previamente borbulhado em água destilada contida em um umidificador, que logo após passava por um disco de vidro sinterizado com a finalidade de formar a coluna de bolhas e espuma através do caldo fermentado.

A vazão do gás pressurizado foi controlada manualmente por uma válvula agulha inserida na tubulação e medida por um rotômetro da marca Aaborg Instruments, com uma faixa de leitura variando de 0 até 100 mL/min. E as amostras retiradas da coluna foram coletadas acima do disco de vidro sinterizado através de um canalito.

Na coluna de espuma, localiza-se um tubo acentuado o qual favorecia o decaimento da espuma, sendo a mesma direcionada a um recipiente de vidro que servia como reservatório da espuma contendo um quebrador de espuma formado por uma haste com duas pás com o intuito de quebrar a espuma nela contida. A haste era alimentada por um motor ao qual se pode mudar a rotação manualmente. O líquido resultante da ruptura decorrente do quebrador de espuma foi então coletado para posterior análise. A Figura 3.1 demonstra o aparato utilizado para o fracionamento da surfactina em coluna de bolhas e espuma.

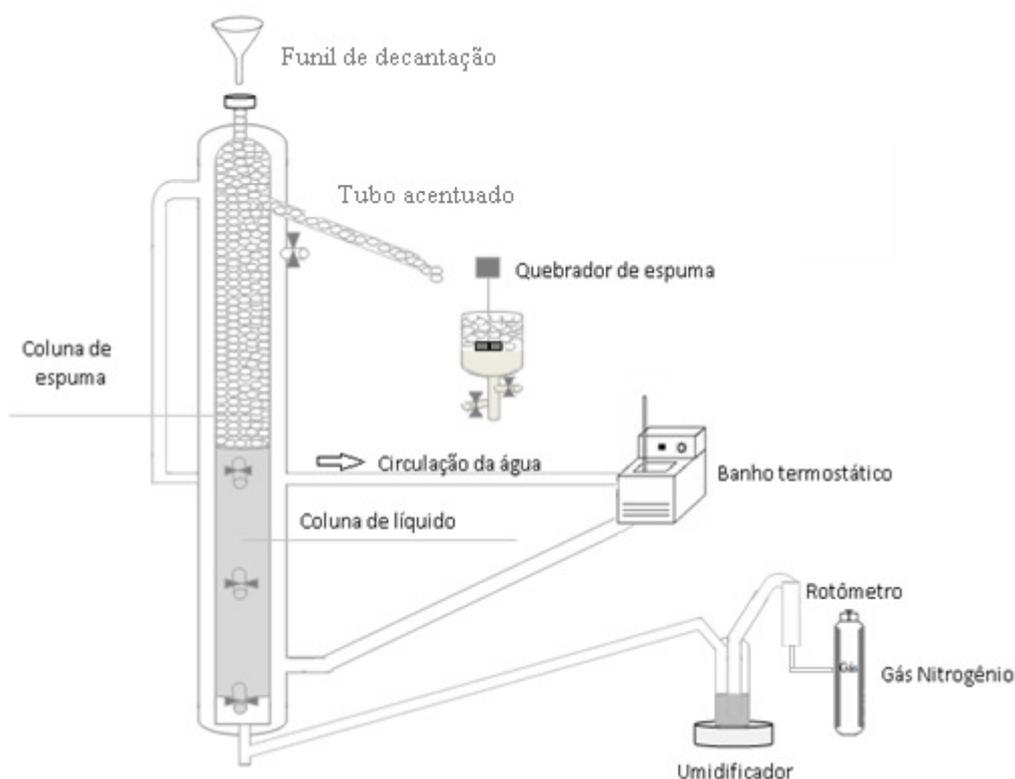


Figura 3.1: Aparato experimental utilizado no fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma operada de modo semi-batelada.

3.5 Operação da coluna de fracionamento

Os experimentos ocorriam com a transferência de 400 mL de solução de surfactina semi purificada, preenchendo a coluna do líquido com 51 cm de altura. Após essa introdução da solução de surfactina, aguardava-se que o mesmo atingisse o equilíbrio térmico medido com o auxílio de um termômetro. Quando essa solução atingia a temperatura desejada (15, 25 ou 35° C), foi liberado o gás nitrogênio umidificado através da base da coluna com diferentes vazões (20, 40 ou 60 mL/min).

Após um certo intervalo de tempo da introdução de gás, ocorria o surgimento de bolhas devido à passagem do gás pelo vidro sinterizado na base da coluna, ascendendo assim na coluna de líquido. O tempo quando essas bolhas atingia o ápice da coluna de líquido foi medido por cronometro e através de cronômetro, obtendo-se assim uma coluna de bolhas. As amostras foram então coletadas em intervalos de tempos regulares de 5 minutos, com a retirada de 5 mL de amostra usando de um canalículo próximo ao disco de vidro sinterizado.

As bolhas de gás ao saírem da coluna de bolhas provocavam o surgimento de uma coluna de espuma. A espuma formada era arrastada pelo gás e quando a mesma atingia o topo da coluna de fracionamento, coletava-se a amostra líquida resultante da quebra da espuma em função do tempo em intervalos pré-estabelecidos de 5 minutos.

A obtenção do produto de topo se dava pela ruptura das células de espuma que deixava a coluna, devido à ação do agitador instalado no interior do recipiente de vidro, local sob a qual a espuma era despejada. As amostras do produto de topo e da solução de surfactina presente na coluna de bolhas eram coletadas em frascos apropriados e liam-se suas respectivas tensões superficiais a 26° C. Após o término das leituras, as amostras eram descartadas.

A corrida experimental foi finalizada quando se observava que a solução não mais formava uma coluna de espuma, ou seja, impossibilitando manter a sustentação da coluna de espuma até o topo, para a mesma vazão de gás. A partir de então, interrompia-se o fornecimento de gás para a coluna e desligava-se o motor que impulsionava o agitador.

Ao final de cada experimento, retirava-se a solução remanescente na coluna de fracionamento e todo o aparato experimental era lavado duas vezes com água destilada e finalmente enxaguada com água MilliQ.

3.6 Quantificação das amostras coletadas da coluna de bolha e espuma

As amostras coletadas tanto na coluna de bolhas quanto da espuma foram analisadas por tensiometria. As leituras foram realizadas a uma temperatura de 26° C no tensiômetro (Attension Sigma 700), pelo método da placa (Platinum Wilhelmy Plate). As amostras quando necessário foram diluídas com água deionizada para que as medidas das tensões se enquadrassem na faixa da curva de calibração.

Para a medição das amostras, 1 mL da amostra (quando necessário) era diluído em 24 mL de água deionizada e transferida para uma cubeta de vidro e introduzia-se no tensiômetro, já calibrado com água destilada. E logo após eram realizadas a medida de tensão superficial em mN/m, as quais foram convertidas à concentração utilizando a curva analítica de calibração da surfactina.

3.7 Desempenho do fracionamento de espuma

O desempenho do fracionamento em coluna de bolhas e espuma foi observado por meio da determinação do enriquecimento e da recuperação da surfactina na espuma para cada tempo, as equações utilizadas para tal análise são:

$$\text{Enriquecimento} = \frac{C_L}{C_E} \quad (4)$$

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{M_E}{M_E + M_L} \right) \times 100\% \quad (5)$$

Onde: C_E é a concentração do biossurfactante na espuma;

C_L a concentração inicial no líquido;

M_E é a massa do biossurfactante na espuma;

M_L a massa inicial do biossurfactante.

3.8 Curva de calibração da surfactina padrão de *Bacillus subtilis*

Uma suspensão de surfactina padrão com grau de pureza $\geq 98\%$ foi preparada em uma concentração de 20 mg/L. A solução foi posteriormente agitada durante 24 h em agitador magnético (Quimis) e mantida em banho termostático (Nova Ética) a uma temperatura de 45° C. Durante o intervalo de 12 h de agitação, a suspensão foi sonicada por 35 min, com o intuito de acelerar a solubilização da surfactina.

A partir dessa solução, foram realizadas diluições sucessivas variando-se de 0 a 20 mg/L de surfactina, as quais, mediram-se suas respectivas tensões superficiais, a 26°C, adotando-se o método da Placa (Platinum Wilhelmy Plate) para análise da tensão superficial, no tensiômetro (Attension Sigma 700). Então, obteve-se a curva de calibração que relaciona a tensão superficial de surfactina, dada mN/m, com a sua concentração, expressa em mg/L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo serão apresentados, analisados e discutidos os resultados obtidos no fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma.

4.1 Análise estatística das variáveis em função da recuperação média ($R_M\%$) e enriquecimento médio (E_M) da surfactina

Na análise estatística das variáveis estudadas no processo de fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma foi realizado em planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios experimentais. O qual teve como objetivo investigar a influência das variáveis independentes como concentração inicial de surfactina (níveis: 266,6, 425 e 569,7 mg/L), temperatura de operação da coluna (níveis: 15, 25 e 35 °C) e vazão volumétrica de gás (níveis: 20, 40 e 60 mL/min), e duas variáveis respostas o enriquecimento médio (E_M) e recuperação média ($R_M\%$) da surfactina produzida pelo *Bacillus sp* ITP 001.

A matriz de experimento (Tabela 4.1) apresenta as respostas para recuperação média ($R_M\%$) e enriquecimento médio (E_M) por meio da combinação dos níveis de fatores, na forma real e codificada. As variáveis estudadas no processo de fracionamento em coluna de bolhas e espuma são representadas na matriz por X_1 (Vazão volumétrica do gás), X_2 (Concentração inicial de surfactina) e X_3 (Temperatura).

Na Tabela 4.1 observou-se que os pontos centrais para as respostas de recuperação média ($R_M\%$) e enriquecimento médio (E_M) apresentaram pouca variação, indicando boa reprodutibilidade do processo, pois, o desvio padrão foi baixo com valor de 0,12.

Verificou-se que para a menor concentração de surfactina (266,6 mg/L), temperatura de 35°C e baixa vazão de gás (20 mL/min) o enriquecimento médio foi mais elevado (47,14 vezes) e na recuperação média do biossurfactante obteve-se 98,69 %, ao contrário das condições de vazão (60 mL/min), temperatura de 35° C e concentração de 569,7 mg/L onde o enriquecimento médio foi menos significativo (3,71 vezes) e a recuperação média foi de 83,10%, esses resultados evidenciam que as condições operacionais (vazão, concentração e temperatura) utilizadas no processo de fracionamento da surfactina influenciaram nos resultados do enriquecimento médio (E_M) ao contrário da recuperação média ($R_M\%$) observando que somente a vazão foi significativa para o processo.

Demonstrando assim que o valor de recuperação média da surfactina foi maior e o enriquecimento médio da surfactina no presente trabalho esta em concordância com a literatura, como no caso de DAVIS *et al.* (2001), que obteve cerca de 97,1% de recuperação de surfactina e valores de enriquecimento entre 2,3 a 51,6 % em sistema sem integração e com isenção de células, formado apenas por uma coluna de fracionamento utilizando o microorganismo *Bacillus subtilis*. Em outro trabalho desenvolvido por CHEN *et al.* (2006), em um sistema integrado a recuperação foi de 92,3 % e o enriquecimento de 50 vezes.

Tabela 4.1: Delineamento experimental dos valores de Recuperação média ($R_M\%$) e Enriquecimento médio (E_M) de acordo com um fatorial 2^3 (variáveis codificadas e valores reais).

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais			Respostas	
	Fatores			X_1	X_2	X_3	E_M	R_M
	X_1	X_2	X_3	(mL/min)	(mg/L)	(°C)		(%)
1	-1	-1	-1	20	266,6	15	28,94	97,32
2	1	-1	-1	60	266,6	15	5,28	84,78
3	-1	1	-1	20	569,7	15	8,73	95,73
4	1	1	-1	60	569,7	15	5,54	86,55
5	-1	-1	1	20	266,6	35	47,14	98,69
6	1	-1	1	60	266,6	35	6,55	89,43
7	-1	1	1	20	569,7	35	14,05	95,98
8	1	1	1	60	569,7	35	3,71	83,10
9	0	0	0	40	425,0	25	3,64	90,84
10	0	0	0	40	425,0	25	3,81	91,13
11	0	0	0	40	425,0	25	3,68	89,68

X_1 : VAZÃO VOLUMÉTRICA DO GÁS (mL/min)

X_2 : CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SURFACTINA (mg/L)

X_3 : TEMPERATURA (°C)

($R_M\%$): RECUPERAÇÃO MÉDIA

(E_M): ENRIQUECIMENTO MÉDIO

Os valores da análise de variância (ANOVA) foram gerados pelo programa Statistic (versão 7). A influencia dos níveis estudados sobre as respostas enriquecimento médio e recuperação média de surfactina em coluna de bolhas e espuma são mostrados nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente.

Analisando-se a Tabela 4.2 (Análise da variância), verificou-se que para o enriquecimento médio (E_M) todas as variáveis e interações foram significativas, indicando uma relevância de nível de confiança em 99%, já que os valores de $p < 0,1$.

Tabela 4.2: Análise da variância (ANOVA) para o enriquecimento médio da surfactina

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(1) $X_1(L)$	756,216*	1*	756,2161*	13447,83*	0,000074*
(2) $X_2(L)$	390,322*	1*	390,3218*	6941,11*	0,000144*
(3) $X_3(L)$	65,895*	1*	65,8952*	1771,82*	0,000852*
$X_1(Q)$	260,511*	1*	260,5110*	4632,68*	0,000236*
1 L com 2 L	321,565*	1*	321,5648*	5718,40*	0,000175*
1 L com 3 L	72,481*	1*	72,4808*	1288,93*	0,000775*
2 L com 3 L	31,920*	1*	31,9200*	212,61*	0,004670*

Onde: (1) vazão;
 (2) concentração;
 (3) temperatura;
 (L) modelo linear;
 (Q) modelo quadrático;
 *Significância a 99%;
 $R^2 = 0,99374$.

Na Tabela 4.3 (Análise de variância para recuperação média) somente a variável vazão (X_1) foi significativa ao nível de 99%, devido $p < 0,1$ ao contrário das demais variáveis X_2 e X_3 e suas interações com resultados de $p > 0,1$.

Tabela 4.3: Análise da variância (ANOVA) para a recuperação média da surfactina

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(1) X ₁ (L)	240,4625*	1*	240,4625*	27,67105*	0,034291*
(2) X ₂ (L)	9,8125	1	9,8125	1,12916	0,399291
(3) X ₃ (L)	0,9940	1	0,9940	0,11439	0,767405
X1(Q)	3,1360	1	3,1360	0,36087	0,609031
1 L com 2 L	0,0085	1	0,0085	0,00097	0,977956
1 L com 3 L	0,0221	1	0,0221	0,00254	0,964404
2 L com 3 L	10,6261	1	10,6261	1,22279	0,384030

Onde: (1) vazão;
 (2) concentração;
 (3) temperatura;
 (L) modelo linear;
 (Q) modelo quadrático;
 *Significância a 99%;
 $R^2 = 0,9793$.

As Figuras 4.1 e 4.2 (ambas Gráficos de Pareto para enriquecimento médio (E_M) e recuperação média ($R_M\%$), respectivamente) evidenciam a significância das variáveis conforme resultado na análise de variância (ANOVA).

A Figura 4.1 mostra o Gráfico de Pareto para o enriquecimento médio (E_M), sendo possível observar que as variáveis X₁ (vazão), X₂ (concentração), X₃ (temperatura) e suas interações foram significativas ao nível de confiança de 99%, convém ressaltar que a vazão (X₁) demonstrar ser a variável mais significativa para o processo. A Figura 4.2 mostra o Gráfico de Pareto para recuperação média ($R_M\%$), sendo possível observar que somente a vazão (X₁) foi significativa a 99% ao contrário das outras variáveis e interações não significativas para o processo.

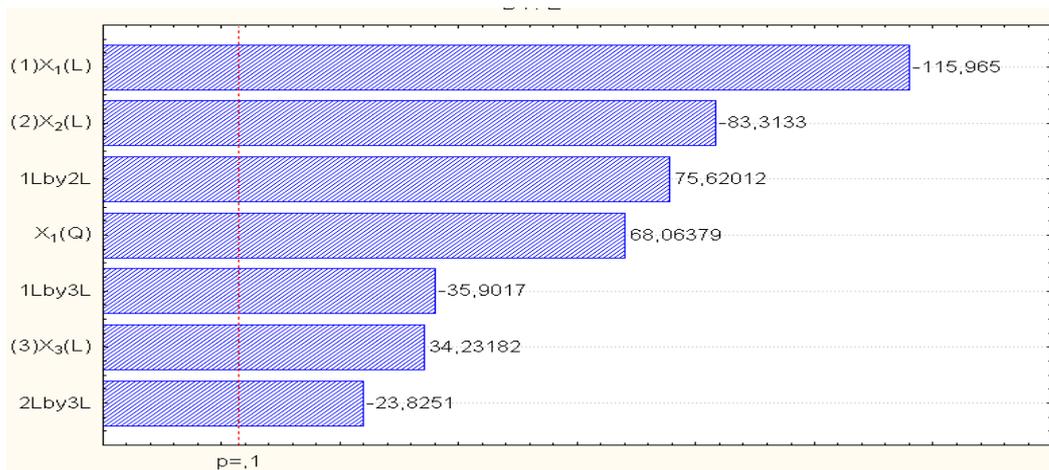


Figura 4.1: Gráfico de Pareto para o enriquecimento médio da surfactina.

Onde: (1) vazão, (2) concentração, (3) temperatura, *Significância a 99%.

(L) modelo linear, (Q) modelo quadrático.

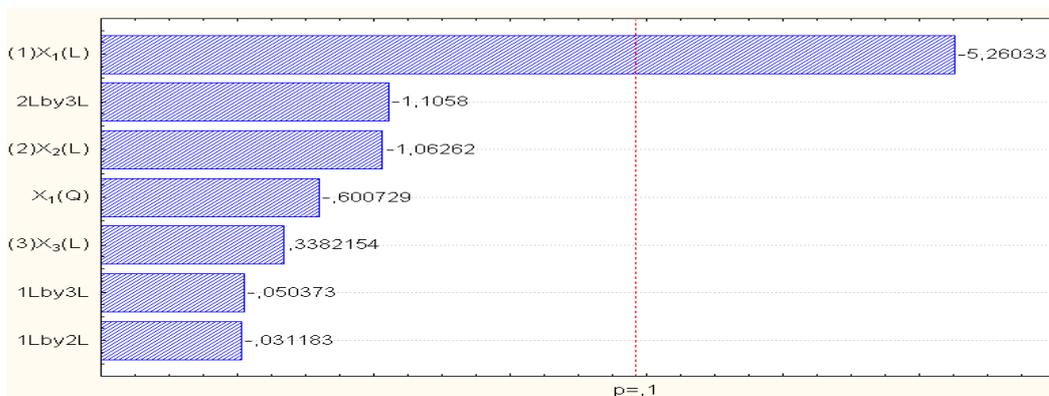


Figura 4.2: Gráfico de Pareto para a recuperação média ($R_M\%$) da surfactina.

Onde: (1) vazão, (2) concentração, (3) temperatura, *Significância a 99%.

(L) modelo linear, (Q) modelo quadrático.

As superfícies de resposta são apresentadas nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 para o enriquecimento médio da surfactina, e demonstram a relação entre os efeitos estudados. De acordo com a superfície de resposta (Figura 4.3) pode-se afirmar que a melhor região para o enriquecimento médio referente à vazão e a concentração, encontra-se em vazões volumétricas de gás $\ll 40$ mL/min e concentrações de surfactina \ll que 400 mg/L, ou seja, na menor vazão volumétrica do gás no caso 20 mL/min e na menor concentração de 266,6 mg/L, obteve-se um enriquecimento máximo de surfactina de 47,14.

Na Figura 4.4, pode-se afirmar que a melhor região para o enriquecimento médio referente à vazão e a temperatura, encontra-se na menor vazão no caso 20 mL/min e uma ampla faixa de temperatura. Para a Figura 4.5, observa-se que a melhor região esta situada em uma menor concentração de 266,6 mg/L e uma ampla faixa de temperatura.

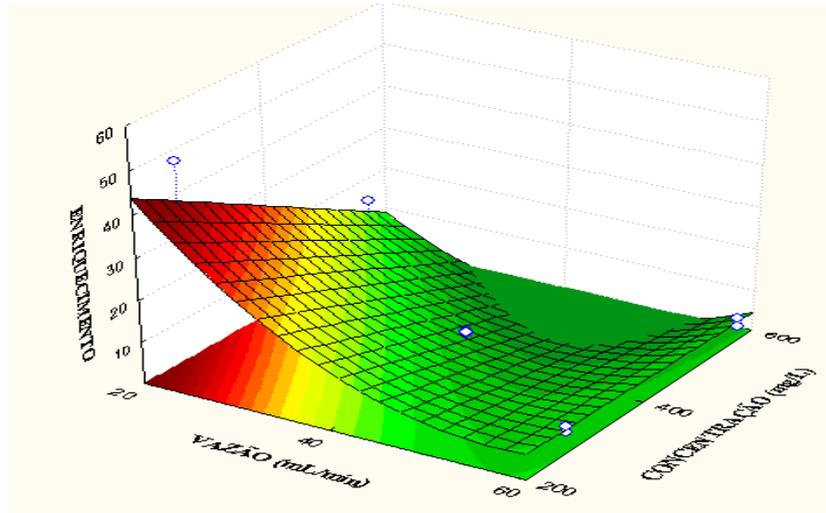


Figura 4.3: Superfície de resposta para o enriquecimento médio da surfactina com a interação da vazão com a concentração.

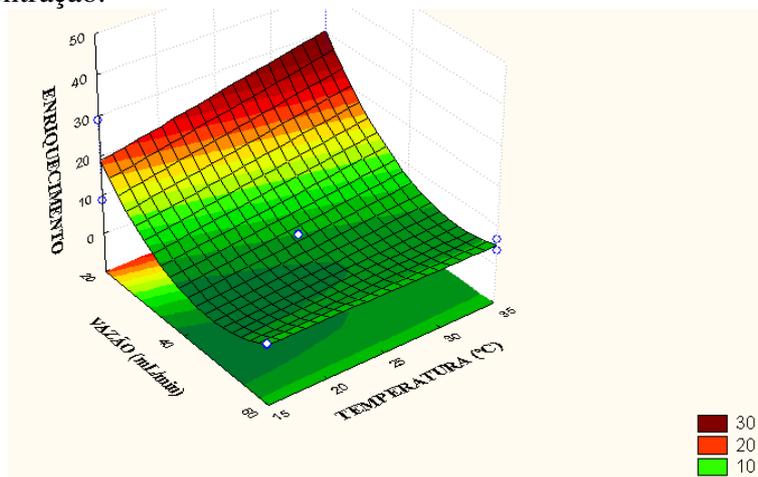


Figura 4.4: Superfície de resposta para o enriquecimento médio da surfactina com a interação da vazão com a temperatura.

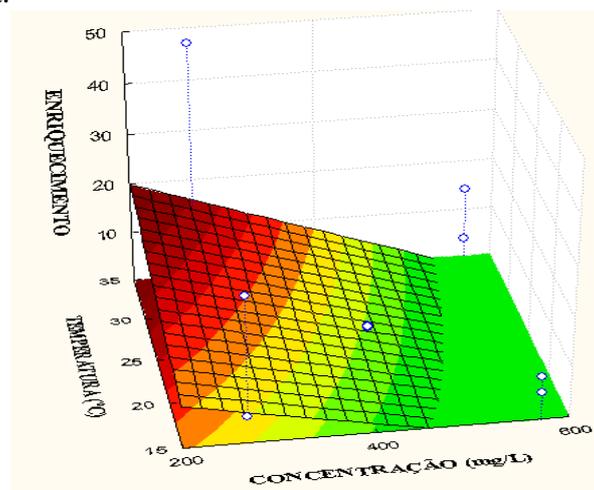


Figura 4.5: Superfície de resposta para o enriquecimento médio da surfactina com a interação da concentração com a temperatura.

A superfície de resposta para recuperação média ($R_M\%$) são apresentadas nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8; as quais apresentam a relação entre os efeitos estudados. De acordo com a superfície de resposta (Figura 4.6) pode-se afirmar que a melhor região para recuperação média da surfactina referente à vazão e a temperatura, encontra-se em vazões abaixo de 40 mL/min e em ampla faixa de temperatura variando de 15 a 35°C, ou seja, a variação da temperatura não influencia a recuperação quanto à vazão.

Na Figura 4.7, pode-se afirmar que a melhor região para a recuperação média da surfactina referente à interação vazão e a concentração, encontra-se na menor vazão no caso 20 mL/min e ampla faixa de concentração de 269,9 a 569,7 mg/L que não influencia na recuperação. Para a Figura 4.8, observa-se que a melhor região esta situada em menores concentração de 400 mg/L e faixa de temperatura maiores que 15°Ce com isso essas variáveis não influenciam na recuperação.

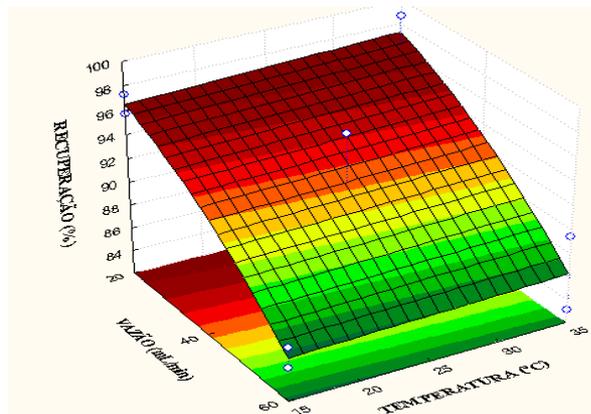


Figura 4.6: Superfície de resposta para recuperação média da surfactina com a interação da vazão com a temperatura.

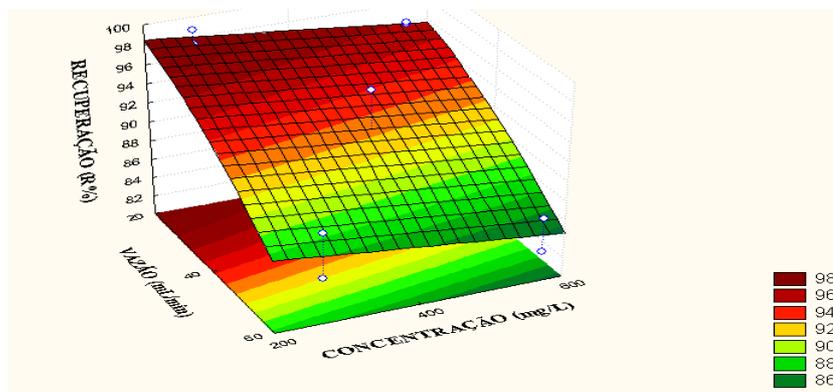


Figura 4.7: Superfície de resposta para recuperação média da surfactina com a interação da vazão com a concentração.

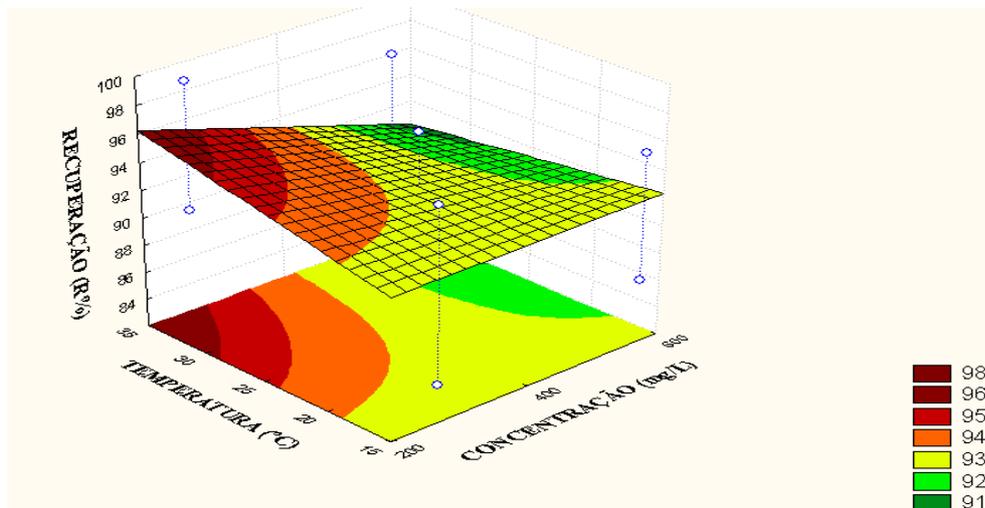


Figura 4.8: Superfície de resposta para recuperação média da surfactina com a interação da concentração com a temperatura.

Portanto, de acordo com a análise estatística para determinação das possíveis variáveis que afetam o processo de fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma, observou-se que a menor concentração (266,6 mg/L), a maior temperatura (35°C) e a menor vazão (20 mL/min) teve uma recuperação e enriquecimento médio de surfactina em 98,69% e 47,14, respectivamente.

4.2 - REDUÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA COLUNA DE LÍQUIDO

Observa-se por meio das Figuras 4.9 a 4.17 a variação da concentração de surfactina na coluna de líquido. Durante os primeiros 5 min das corridas experimentais ocorreu um pequeno decréscimo da concentração de surfactina em relação ao segundo ponto de coleta da coluna de líquido em todos os experimentos. A partir do que foi observado provavelmente durante esse intervalo de tempo ocorreram altas taxas de rompimento das bolhas que eram iniciadas na formação da coluna de espuma, ou seja, a surfactina que é adsorvida na coluna de líquido pela interface gás-líquido retorna para coluna de líquido drenado por meio da coluna de espuma. Nesse intervalo de tempo o sistema de separação encontra-se ainda numa fase preliminar de estabilização. Após este período de estabilização a quebra de bolhas diminui na

coluna de espuma, e observa-se uma diminuição progressiva da concentração do tensoativo na coluna líquida, esse fato deve-se a menor quebra de bolhas resultando em uma adsorção da surfactina na superfície da bolha.

Logo após o segundo ponto de coleta verificou-se que a surfactina estava sendo removido da coluna de líquido a uma taxa maior devido à menor quebra de bolhas, ou seja, nesse intervalo de tempo ocorreu uma maior remoção do tensoativo devido ao gradiente de concentração existentes entre a interface gás líquido e o seio da solução.

Em um estudo descrito por ROSA *et al.* (2007) no fracionamento de albumina de soro bovino em colunas de bolhas e espuma, a proteína contida na coluna de líquido também foi adsorvida na interface gás-líquido a uma taxa maior após um certo intervalo de tempo.

Observa-se também em todas as corridas experimentais a estabilização da redução da concentração de surfactina em um determinado tempo, presume-se que essa estabilização esteja relacionada com a concentração micelar crítica (ISHIGAMI *et al.*, 1995).

Em relação às variáveis utilizadas no experimento vazão superficial do gás (20, 40 ou 60 mL/min), temperatura (15, 25 ou 35° C) correlacionadas com a concentração inicial de surfactina (266,6, 425 ou 569,7 mg/L), observou-se que com o aumento da vazão superficial de gás maiores eram as taxas de redução de surfactina na coluna de líquido, esse fato ocorre devido a um maior arraste de solução líquida nos interstício da espuma; maior quantidade de bolhas geradas pelo aumento da vazão, e conseqüentemente mais adsorção de surfactina superfície da bolha.

De acordo com KHALESI *et al.* (2013), um aumento na taxa de fluxo de ar acarreta em um maior transporte de líquido no interior da espuma. Como também a adsorção de biosurfactante devido à maior área superficial oriunda das bolhas de gás (LINKE & BERGER, 2011).

Foi possível observar que a quantidade de coletas do líquido estão relacionada com os valores de vazão (20, 40 ou 60 mL/min) utilizadas nos experimentos e com as concentrações (266,6, 425 ou 569,7 mg/L), pois quanto maior a vazão volumétrica de gás menos número de pontos de coletas foram realizados, ao passo, que para menores vazões volumétricas de gás ocorreu maior número coletas, quanto a concentração percebe-se que utilizando os mesmos valores de vazões, o número de coletas dependem da concentração de surfactina na coluna de líquido.

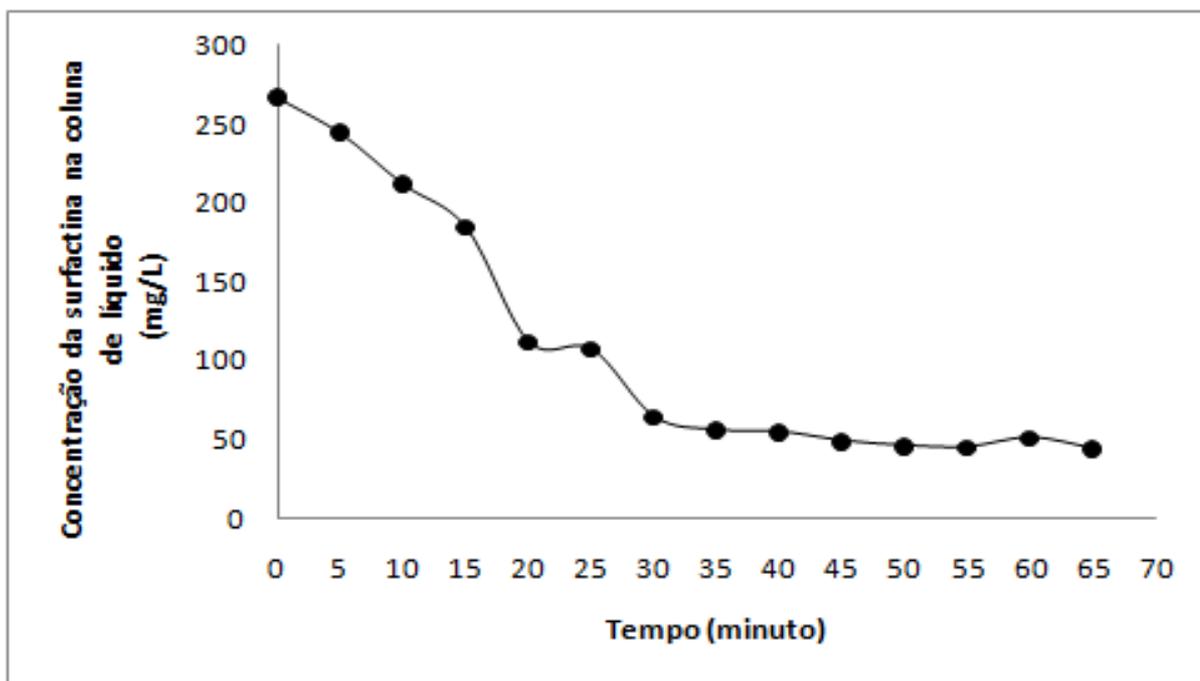


Figura 4.9: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C).

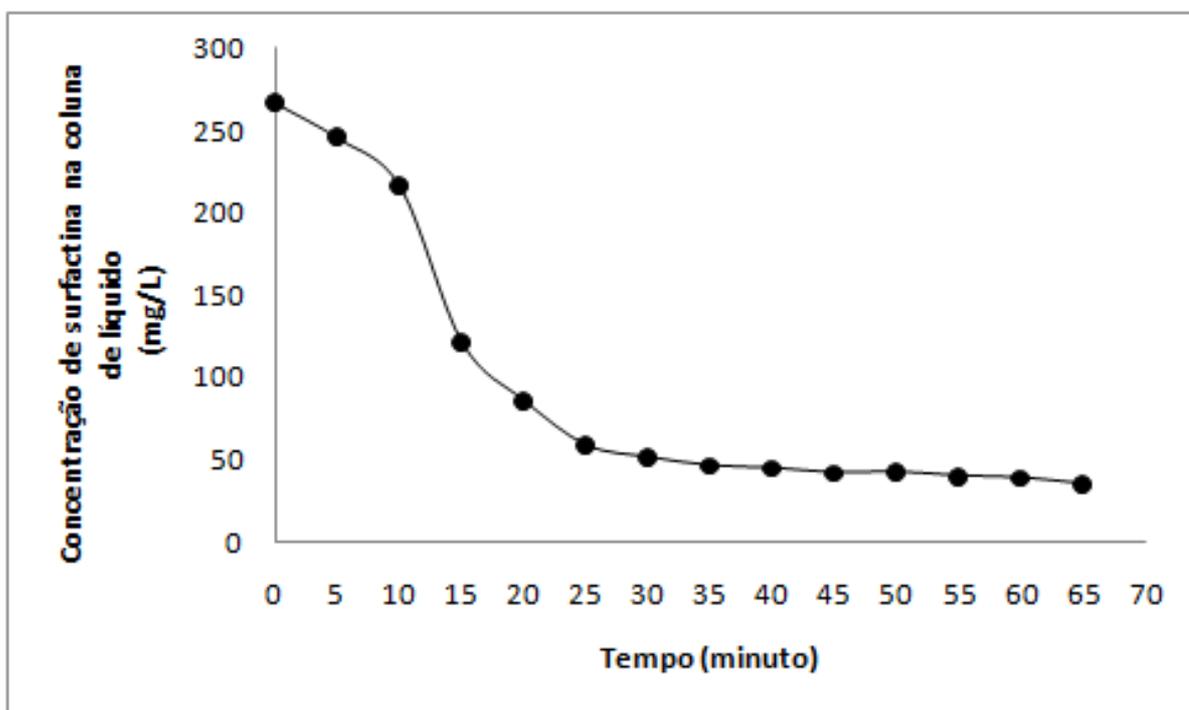


Figura 4.10: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C).

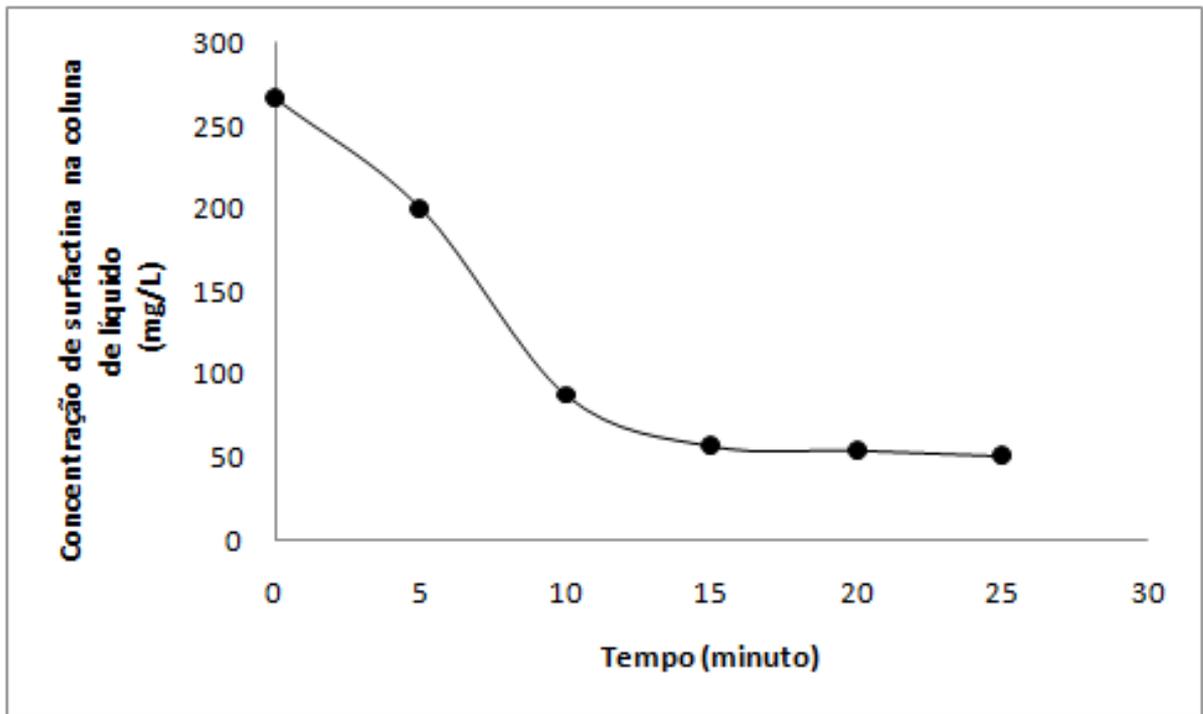


Figura 4.11: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C).

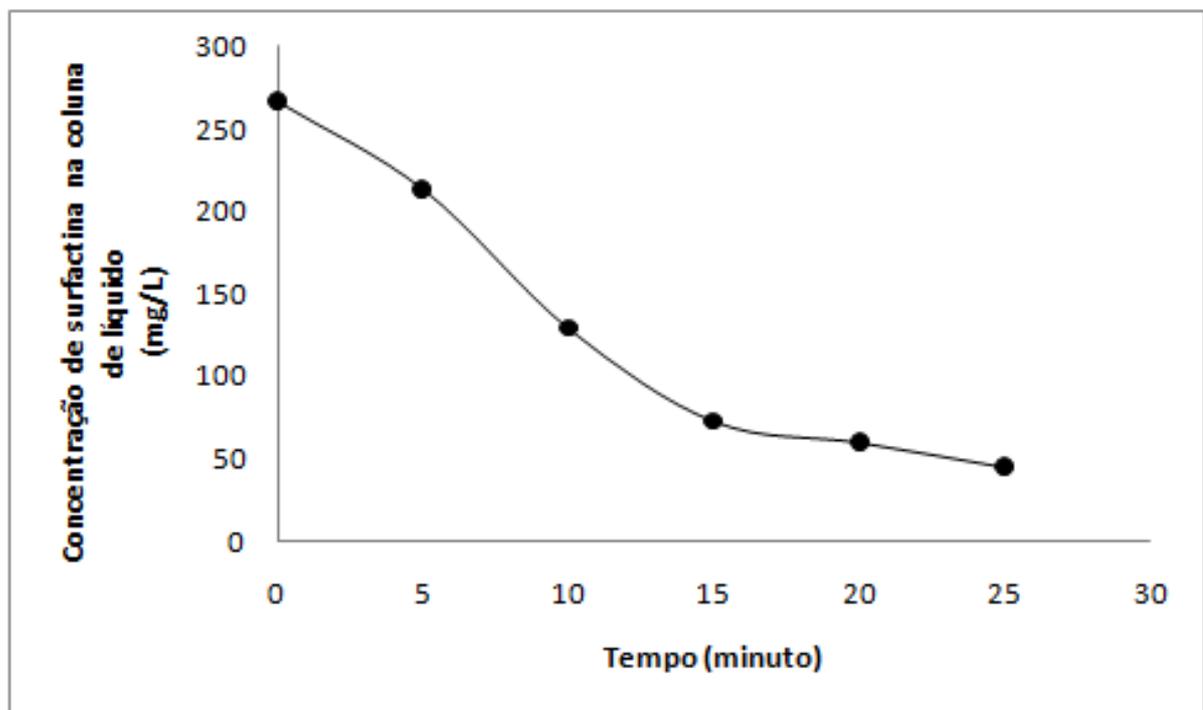


Figura 4.12: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C).

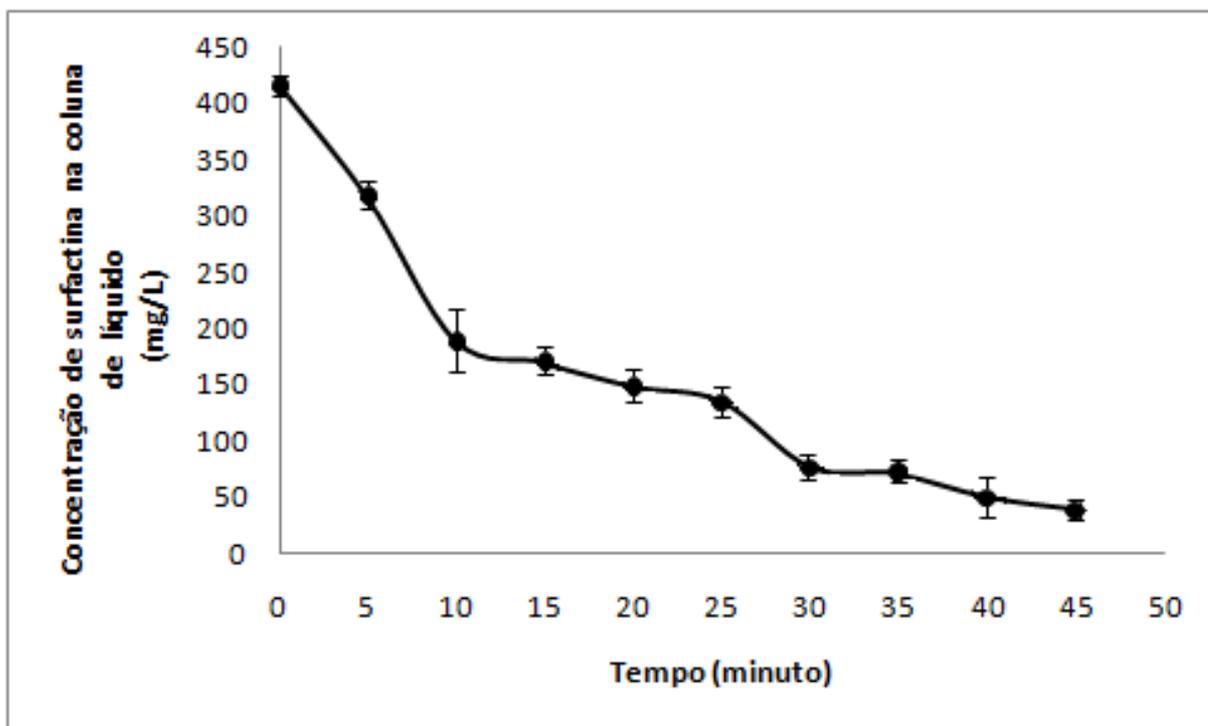


Figura 4.13: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 425,0$ mg/L; $Q = 40$ mL/min; $T = 25$ °C).

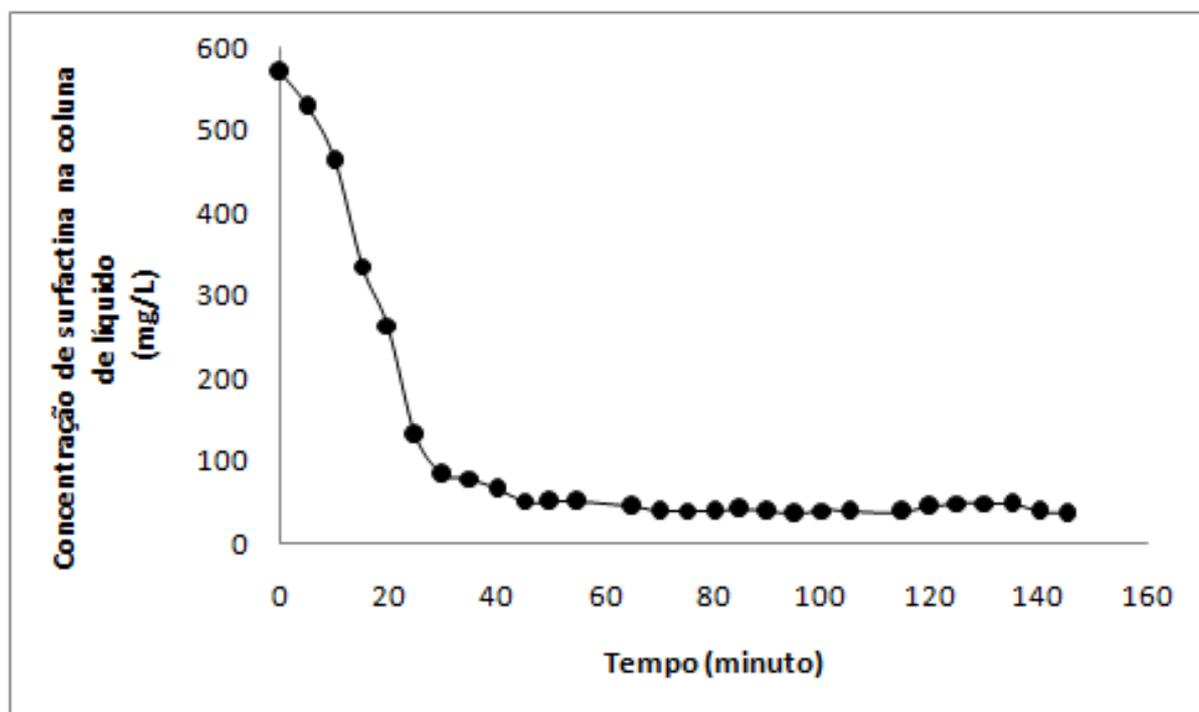


Figura 4.14: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C).

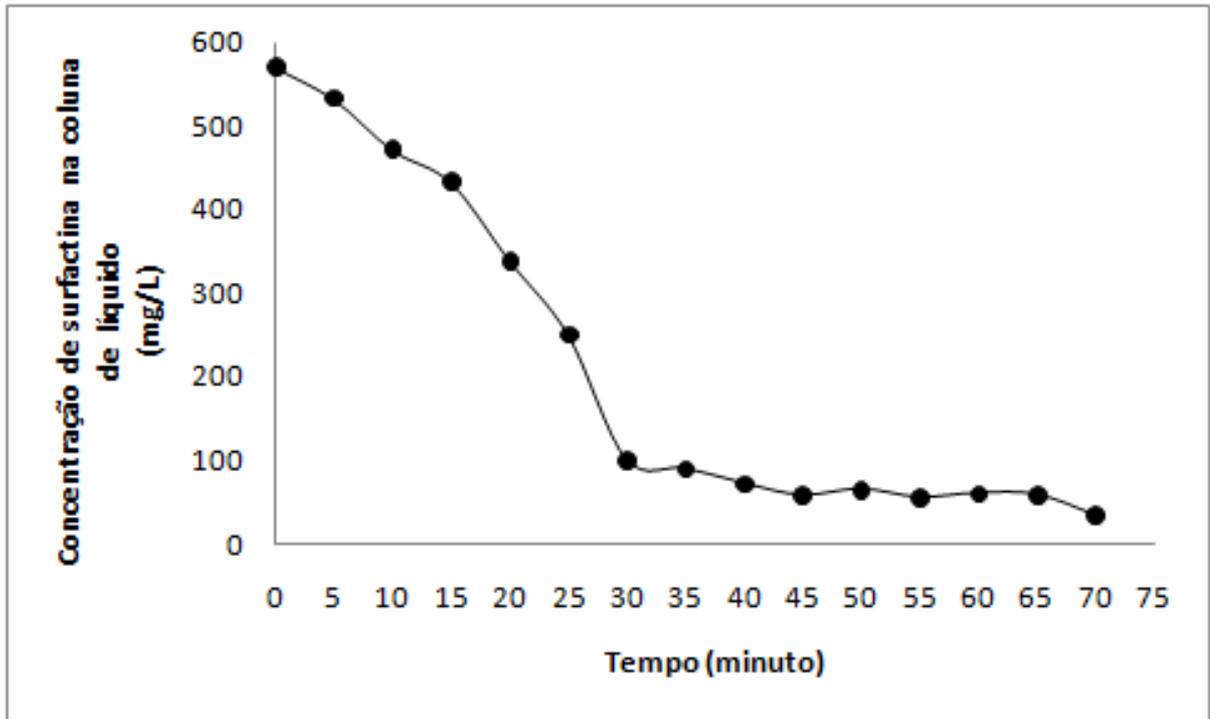


Figura 4.15: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C)

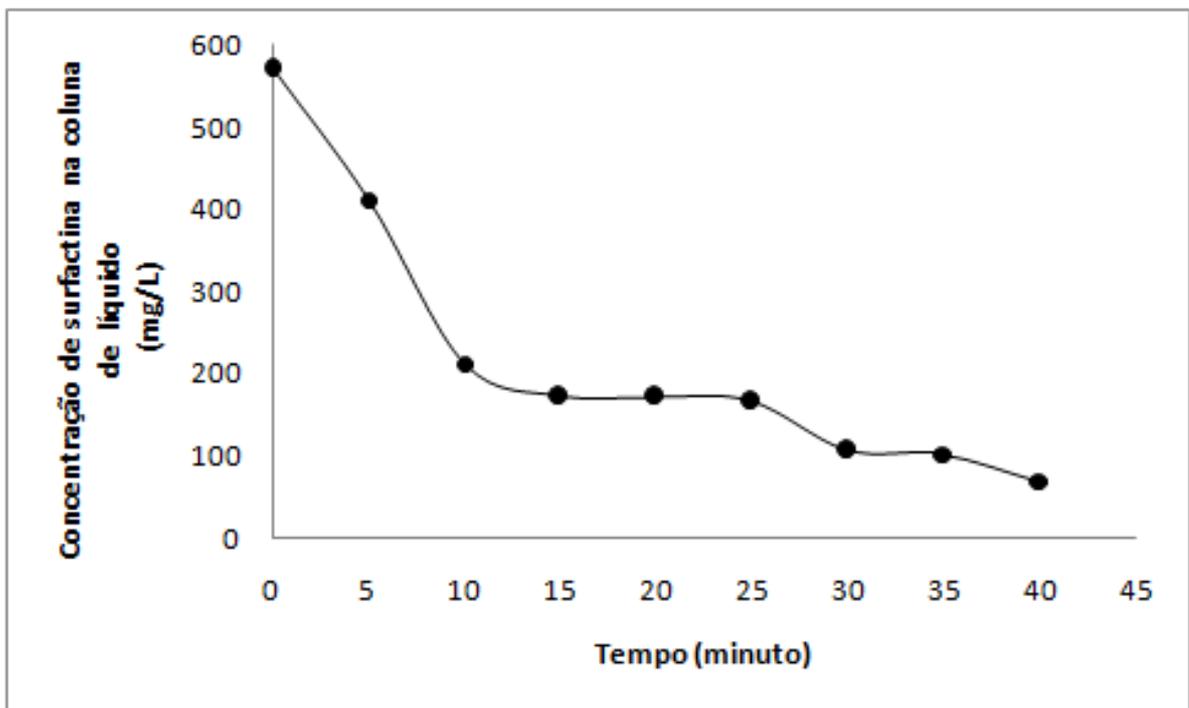


Figura 4.16: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C).

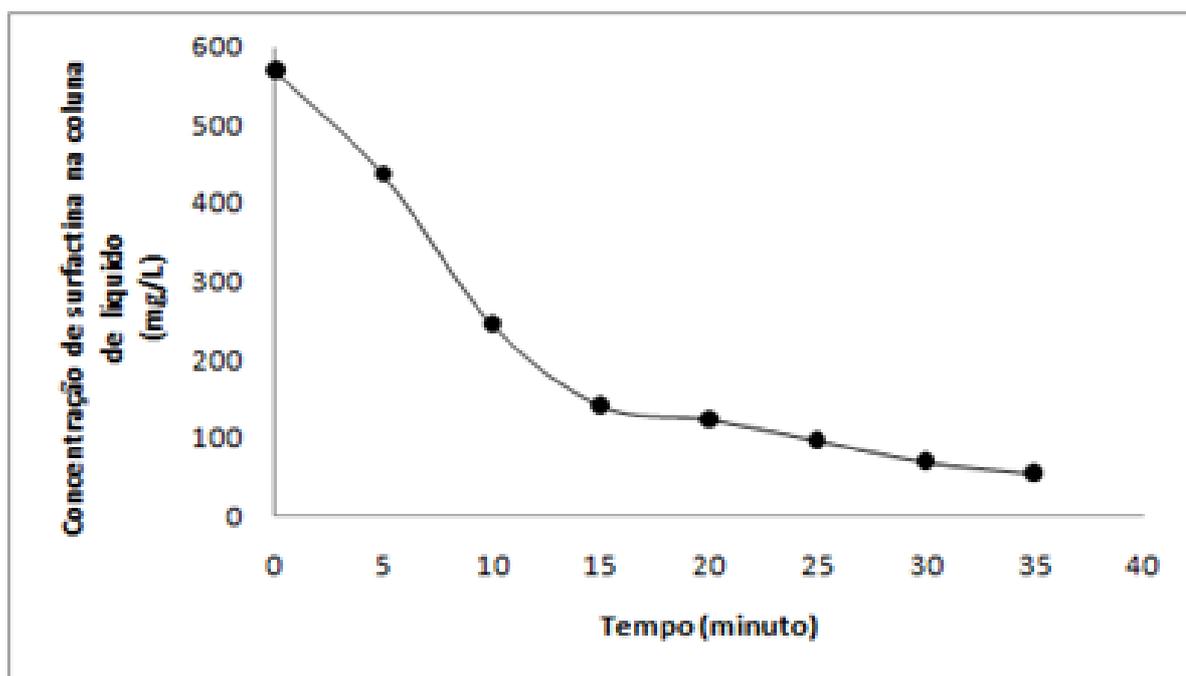


Figura 4.17: Variação da concentração de surfactina na coluna de líquido com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C).

Em relação ao volume final de solução contida na coluna de líquido (Tabela 4.4) ao fim do processo, ressaltando que o volume inicial na coluna de líquido foi de 400 mL de solução de surfactina, observou-se que a maior vazão volumétrica de gás (60 mL/min) ocasiona um menor volume de solução final na coluna de líquido, ou seja, quanto maior a vazão volumétrica de gás mais solução é arrastada da coluna de líquido, através do transporte de solução líquida nas bolhas de gás, e, portanto maior arraste de surfactina presente na coluna de líquido, ao contrario de quando utilizado a menor vazão volumétrica de gás (20 mL/min) resultando em um maior volume de solução na coluna de líquido, decorrente do maior tempo de residência das bolhas na espuma que favorecem a drenagem do líquido nos interstícios da espuma. Quanto à temperatura é possível verificar que quanto maior a temperatura mais líquido é drenado da espuma, tornando a espuma seca, pressumise que o aumento da temperatura favorece a menor viscosidade do líquido, e portanto maior drenagem do líquido nos interstício da espuma.

Tabela 4.4: Valores de solução que permanecem na coluna de líquida ao fim do processo

Vazão vol. (mL/min)	Concentração (mg/L)	Temperatura (°C)	Volume final de solução na coluna de líquido (mL)	
20	266,6	15	310,0	
		35	315,0	
40*	569,7	15	290,0	
		35	317,0	
60	425	25	241,66	
		266,6	15	180,0
			35	195,0
		569,7	15	210,0
35	235,0			

*Experimento em Triplicata

4.3 VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÕES DE SURFACTINA NA ESPUMA

As Figuras 4.18 a 4.26 demonstram os resultados obtidos para surfactina contida na espuma em diferentes condições experimentais (Concentração inicial da surfactina em 266,6, 425 ou 569,7 mg/L, vazão volumétrica de gás em 20, 40 ou 60 mL/min e temperatura de operação da coluna de fracionamento em 15, 25 ou 35° C).

Observou-se a partir das Figuras 4.18 a 4.26, que quando aplicado a maior vazão volumétrica de gás (60 mL/min), o primeiro ponto da coleta teve uma concentração de surfactina maior em relação ao ponto posterior, uma possível explicação para este fato pode ser em decorrência do maior rompimento das bolhas presentes na coluna de espuma, favorecendo assim a liberação da surfactina adsorvidas na interface gás – líquido, uma vez que em altas vazões ocorre ocorrem um maior arraste de solução líquida aumentando assim a concentração de surfactina nos interstício da espuma, enquanto que para a menor vazão volumétrica de gás (20 mL/min), notou-se o oposto, ou seja, o primeiro ponto de coleta teve a menor concentração de surfactina em relação ao segundo ponto.

Observa-se ainda que a variação da concentração de surfactina nas corridas experimentais são decorrentes da quebra das bolhas presentes na coluna de espuma, ou seja, quanto maior a quebra de bolhas menor será a concentração de surfactina em determinado

ponto, como no caso da Figura 4.18, no qual a concentração de surfactina foi menor no tempo de 55 min.

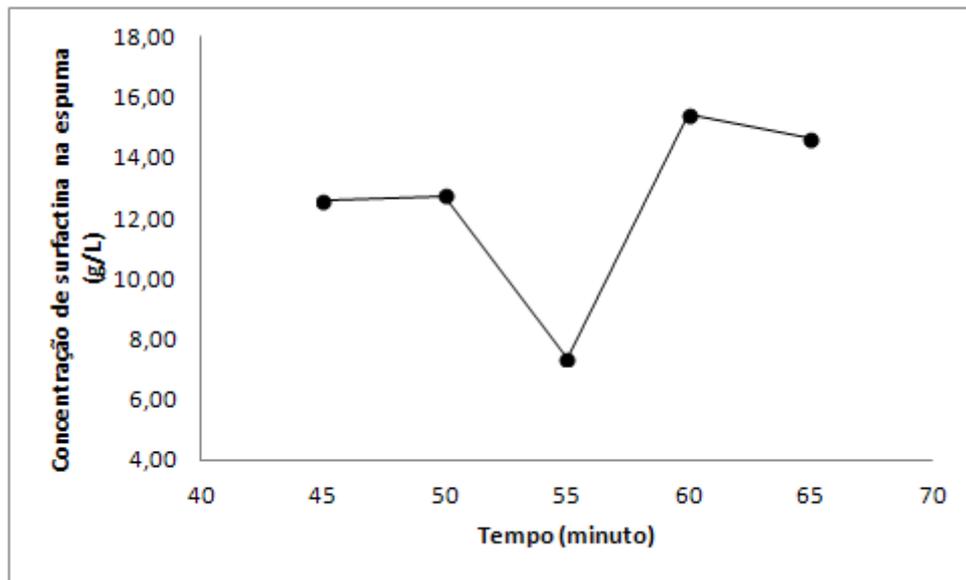


Figura 4.18: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C).

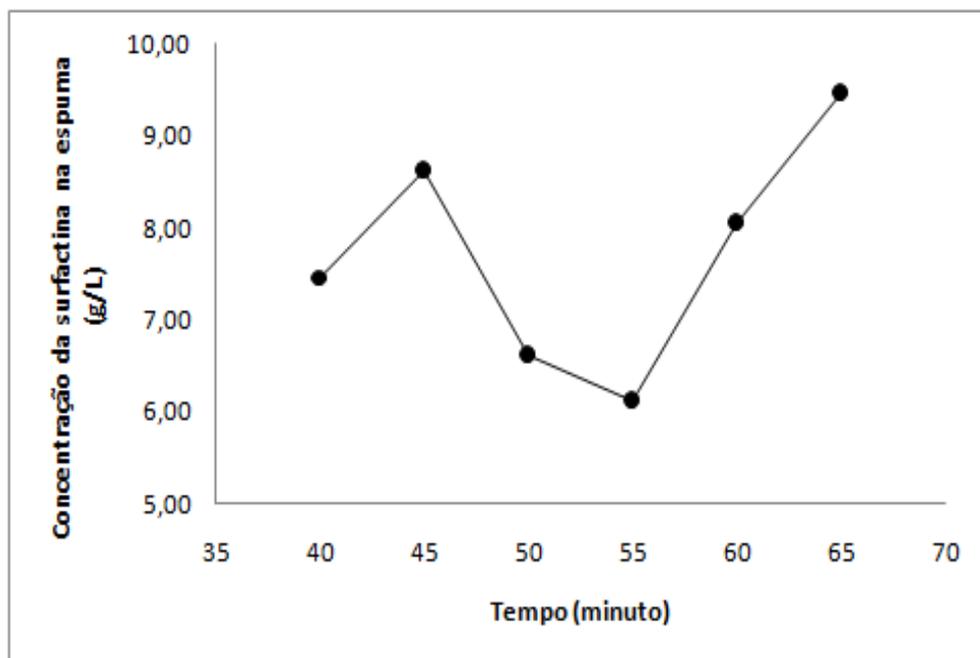


Figura 4.19: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C).

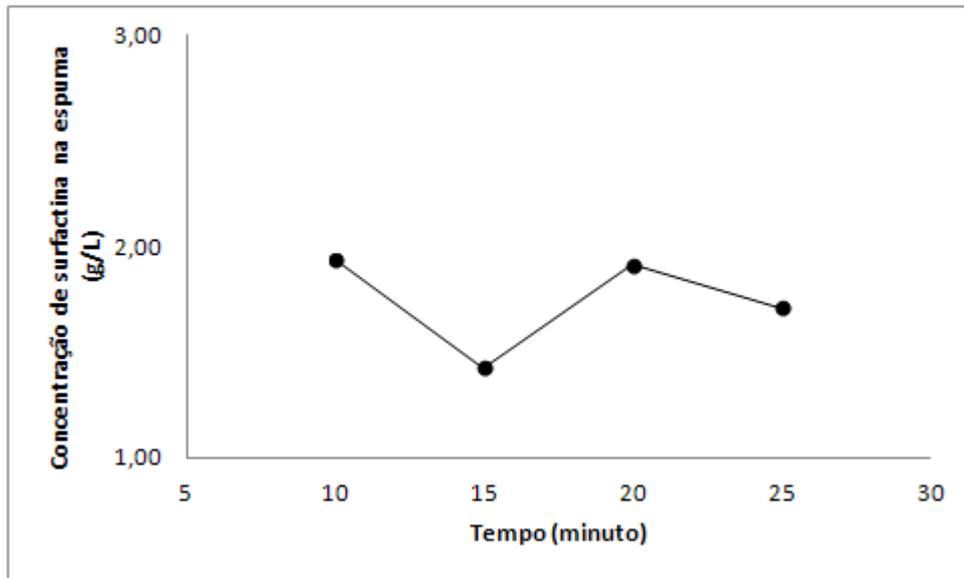


Figura 4.20: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C).

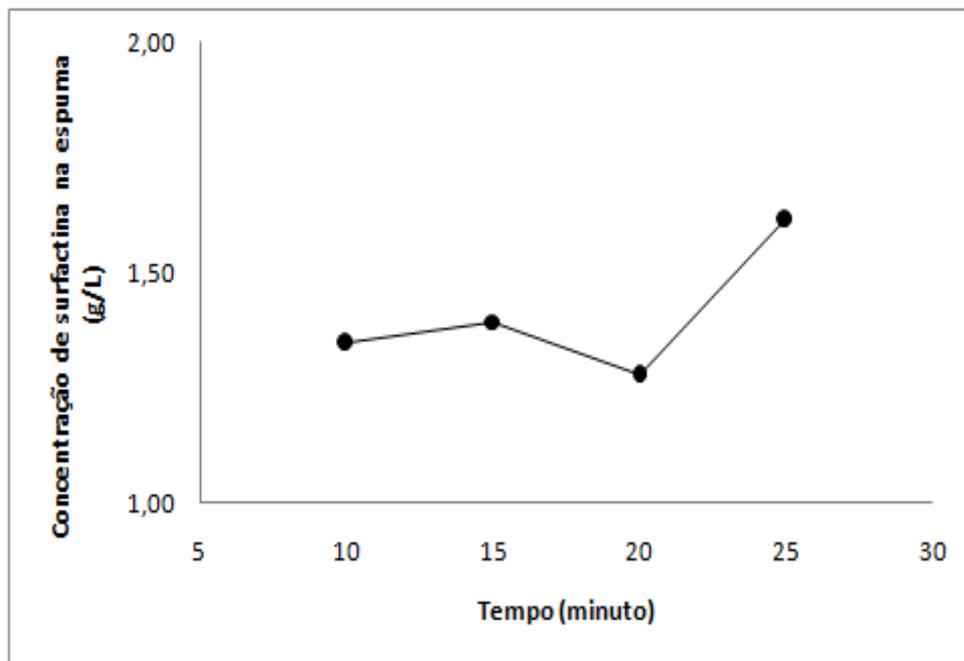


Figura 4.21: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 266,6$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C).

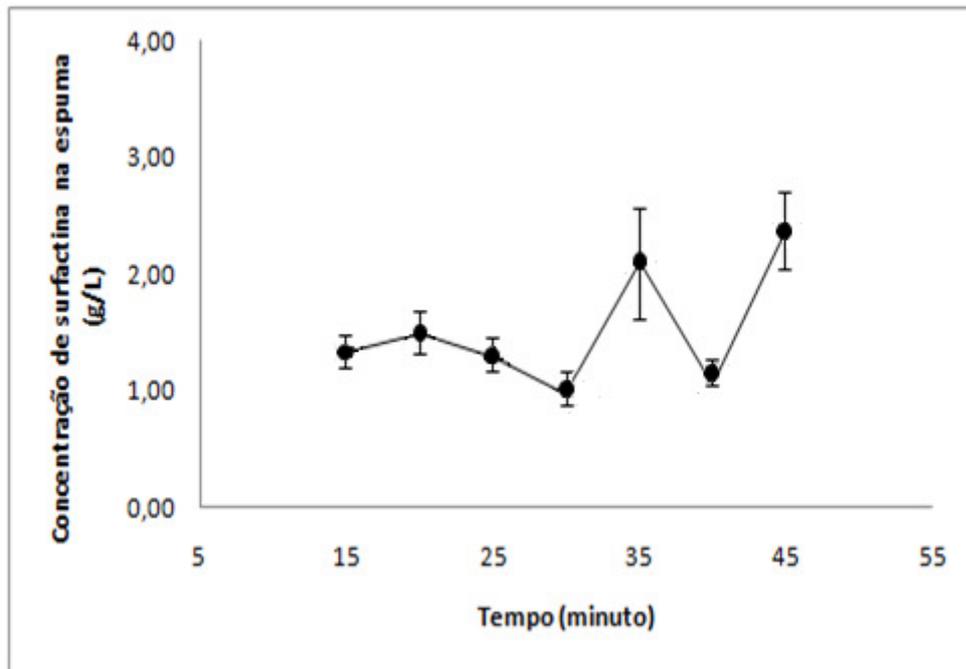


Figura 4.22: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 425$ mg/L; $Q = 40$ mL/min; $T = 25$ °C).

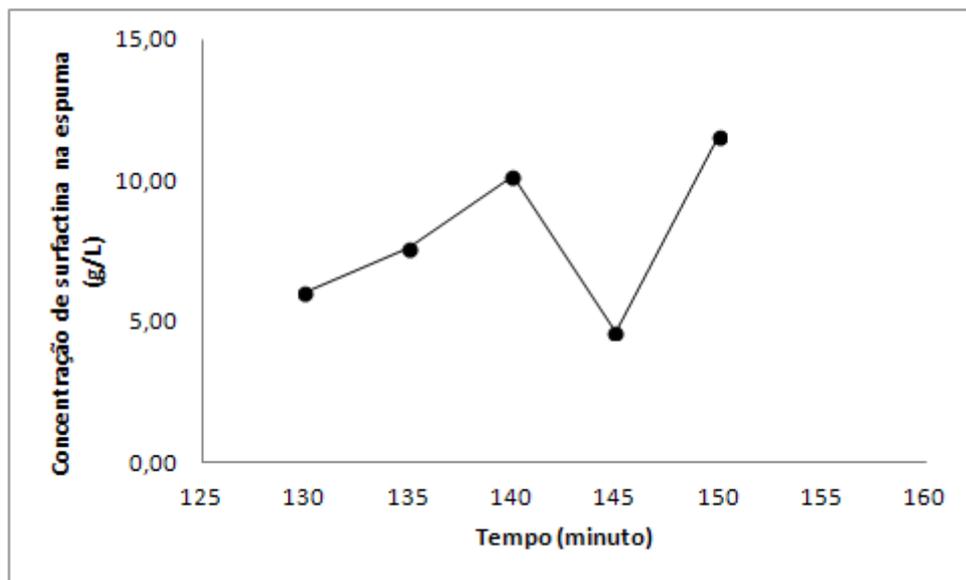


Figura 4.23: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 35$ °C).

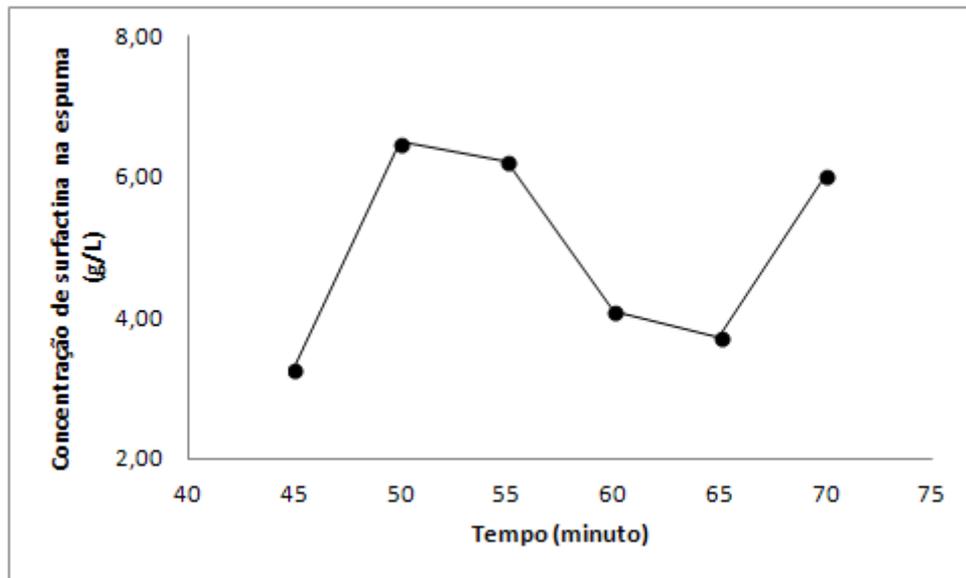


Figura 4.24: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 20$ mL/min; $T = 15$ °C).

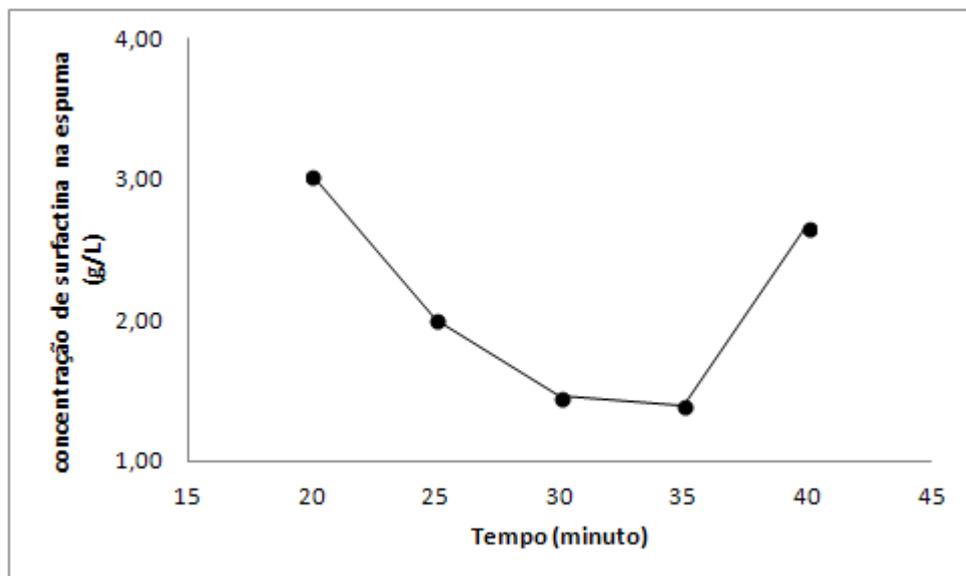


Figura 4.25: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 35$ °C).

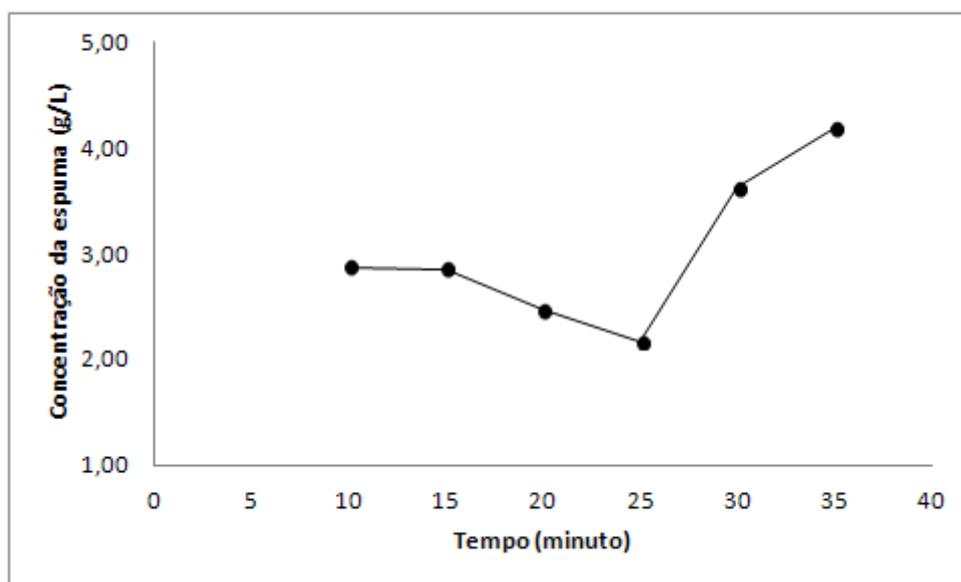


Figura 4.26: Variação da concentração de surfactina na espuma com o tempo ($C_i = 569,7$ mg/L; $Q = 60$ mL/min; $T = 15$ °C).

Observando-se a Tabela 4.7, foi possível verificar que quando aplicado a maior vazão volumétrica de gás (60 mL/min), os valores de concentração média de surfactina ao fim do experimento na espuma variaram de 1,41 a 3,16 g/L, ao passo que para a menor vazão volumétrica (20 mL/min) utilizada no estudo, a variação da concentração média da surfactina na espuma foi de 4,97 a 12,57 g/L, demonstrando assim que os valores de concentração média da surfactina na espuma ao fim do processo foram mais notáveis em menor vazão volumétrica de gás no presente estudo a 20 mL/min, ou seja, menores vazões volumétricas de gás diminuem a quantidade de solução arrastada da coluna de líquido pelas bolhas de gás. Uma explicação para este fato decorre que em menores vazões de gás a espuma é seca devido o tempo de residência das bolhas contidas na espuma serem mais elevados, permitindo assim uma maior drenagem do líquido contido na espuma, e resultando em uma maior concentração de surfactina (BOONYASUWAT *et al.*, 2003).

No tocante ao efeito da temperatura na concentração média de surfactina na espuma no fim do processo (Tabela 4.5), verificou-se que a maior concentração de surfactina na espuma ocorreu à 35°C, uma explicação para esse resultado esta no que foi apresentado no trabalho de SANTANA *et al.* (2003) através do efeito da temperatura na viscosidade da solução, facilitando a drenagem do líquido intersticial na espuma.

Tabela 4.5: Concentração média da surfactina ao fim da corrida experimental.

Vazão vol. (mL/min)	Concentração (mg/L)	Temperatura (°C)	Concentração média da Surfactina ao fim do experimento (g/L)
20	266,6	15	7,71
		35	12,57
40*	569,7	15	4,97
		35	8,00
		25	1,51±0,08
60	266,6	15	1,41
		35	1,75
		15	3,16
		35	2,11

*Experimento em Triplicata

Por meio dos dados experimentais foi possível verificar que o fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma em termos ambientais é um processo de baixo custo econômico e operacional, uma vez que utiliza pouca energia para realização do processo e o manuseio operacional é simples. A metodologia empregada apresenta índices de recuperação média alta e enriquecimento médio em concordância com os resultados (98,69% e 47,14 vezes, respectivamente) quando comparados a literatura.

5 CONCLUSÕES

Baseando-se nas análises dos resultados pode-se concluir que o fracionamento em coluna de bolhas e espuma utilizando *Bacillus sp* ITP 001 apresentou uma recuperação e enriquecimento médio elevado. Neste sentido conclui-se que:

- ✓ Na análise estatística do planejamento experimental, foi verificado que para o enriquecimento médio a vazão, concentração e temperatura foram significativas e para recuperação média somente a vazão foi significativa, ambas ao nível de confiança de 99%.
- ✓ Os maiores valores de enriquecimento médio (47,14 vezes) e recuperação média de 98,69% de surfactina foram obtidos na maior temperatura (35°C), menor vazão volumétrica de gás (20 mL/min) e menor concentração inicial de surfactina (266,6 mg/L).
- ✓ Através da análise de surfactina na coluna de líquido ao fim do experimento observou-se soluções com baixa concentração de surfactina e espuma concentrada em todos os experimentos;
- ✓ Os maiores valores de concentração média da surfactina na espuma variaram de 4,97 a 12,57 g/L na vazão de 20 mL/min.

Com isso, pode-se afirmar que o trabalho mostra a eficácia em concentrar / recuperar a surfactina através da técnica de fracionamento em coluna de bolhas e espuma utilizando o *Bacillus sp* ITP 001.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMSON, A. W. **Physical chemistry of surfaces**. 5 ed. New York: A Wiley-Interscience, 1990.

AKSAY, S.; MAZZA, G. Optimization of protein recovery by foam separation using response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 79, p. 598-606, 2007.

AMANI, H.; SARRAFZADEH, M. H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M. R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 75, p. 209-214, 2010.

ANDREWS, G.; SCHULTZ, F. Differential adsorption of pepsin and rennin on foam. *Proceedings of Biochemical Society*, li-lii, 1945.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, p. 23 – 29, 2012.

ARAUJO, L. V.; ABREU, F.; LINS, U.; ANNA, L. M. S.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion, *Food Research International*, 44, p. 481-488, 2011.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, p. 488-494, 1968.

BHATTACHARJEE, S.; KUMAR, R.; GANDHI, K. S. Prediction of separation factor in foam separation of proteins, *Chemical Engineering Science*, 52(24), p. 4625-4636, 1997.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential, *Appl. Microbiol*, 87, p. 427 – 444, 2010.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos, *Química Nova*, 30 (2), p. 409-414, 2007.

BARRUT, B., BLANCHETON, J-P.; CALLIER, M.; CHAMPAGNE, J-Y.; GRASMICK, A. Foam fractionation efficiency of a vacuum airlift- Application to particulate matter removal in recirculating systems, *Aquacultural Engineering*, p. 1-6,2012.

BAUMGART, F.; KLUGE, B.; ULLRICH, C.; VATER, J.; ZIESSOW, D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177 (3), p. 998-1005, 1991.

BENVEGNI, T.; PLUSQUELLEC, D.; LEMIÉGRE, L. Surfactants from Renewable Sources: Synthesis and Applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Composites from renewable Resources**. 1 ed., Chap. 7, Amsterdam: Elsevier Science, 2008.

BISPERINK, C. G. J.; ROTELTAP, A. D.; PRINS, A. Bubble-size distribution in foams. *Advances in Colloid and Interface Science*, 38, p.13-32, 1992.

BOGAERT, I. N. A. V.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids, *Process Biochemistry*, 46, p. 821-833, 2011.

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

BOONYASUWAT, S.; CHAVADEJ, S.; MALAKUL, P.; SCAMEHORN, J. F. Anionic and cationic surfactant recovery from water using a multistage foam fractionator, *Chemical Engineering Journal*, 93, p. 241-252, 2003.

BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63, p. 73-82, 2008.

BROWN, L.; NARSIMHAN, G.; WANKAT, P. C. Foam fractionation of globular proteins, *Biotechnology and Bioengineering*, 36, p. 947-959, 1999.

BURGHOFF, B. Foam fractionation applications, *Journal of Biotechnology*, 161, p. 126-137, 2012.

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

CAO, X. H.; WANG, A. H.; WANG, C. L.; MAO, D. Z.; LU, M. F.; CUI, Y. Q.; JIAO, R. Z. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF – 7 cells through a ROS/JNK – mediated mitochondrial/caspase pathway, *Chemico – Biological Interactions*, 183, p. 357-362, 2010.

CARAGAY, A. B.; KARGER, B. L. Use of rate phenomena in solvent sublimation, Separation of methyl orange and rhodamine B. *Analytical Chemistry*, 38, p. 652-654, 1966.

CHARM, S. E.; MORNINGSTAR, J.; MATTEO, C. C.; PALTIEL, B. The separation and purification of enzymes through foaming. *Analytical Biochemistry*, 15, p. 498-508, 1966.

CHEN, C.; BAKER, S. C.; DARTON, R. C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, p. 1923-1931, 2006.

CHEN, S. Modeling Surfactant Removal in Foam Fractionation: I Theoretical Development, *Aquacultural Engineering*, 13, p. 163-181, 1994.

CHEN, Y. C.; CHIANG, T. J.; LIANG, T. WANG, I. L.; WANG, S. L. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermal llystable and antimicrobial biosurfactant, *Biocatalysis and Agricultural Biotchnology*, 1, p. 62-69, 2012.

CHRISTOFI, N.; IVSHIRA, I. B. Microbial and their use in field studies of soil remediation, *Journal Applied Microbiology*, 93, p. 915-929, 2002.

CLARKE, A. N.; WILSON, D. J. **Solvent Sublation**. Foam Flotation. ed. 11.; Chap. 6, New York: Marcel Dekker, 1983.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity, *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (8), p. 1426-1429, 1983.

CUBITTO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; SCHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, 15, p.281-287, 2004.

DANA, R. M.; PTAK, M. Interfacial Properties of Surfactin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 153 (1), p. 285-291, 1992.

DARTON, R.C.; SUPINO, S.; SWEETING, K. J. Developmente of a multistage foam fractionation column, *Chemical Engineering and Processing*, 43, p. 477-482, 2004.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, p. 346-354, 2001.

DESAI, J. D.; BANAT, I. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D; DESAI, A.J. Biosurfactants: production, properties and application. In: Kosaric, N. **Production of biosurfactant**. Chap. 3, New York: Marcel Dekker, 1993.

DeSOUSA, S. R.; LALUCE, C.; JAFELICCI Jr, M. Effects of organic and inorganic additives on flotation recovery of washed cells of *Saccharomyces cerevisiaeresuspended* in water, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48, p. 77-83, 2006.

DICKINSON, J. E.; LASKOVSKI, D.; STEVENSON, P.; GALVIN, K. P. Enhanced foam drainage using parallel inclined channels in a single-stage foam fractionation column, *Chemical Engineering Science*, 65, p. 2481-2490, 2010.

DO, D. D. Adsorption analysis equilibria and kinetics. In: YANG, R. T; LANGER, R. S; PAUL, D. R; PRAUSNITZ, J. M; RUCKENSTEIN, E; WEI, J. **Series on Chemical Engineering**. p. VII, London: Imperial College Press, 1998.

DOUILLARD, R.; LEFEBVRE, J.; TRAN, V. applicability of Gibbs law to protein adsorption isotherms, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 78, p. 109 – 113, 1993.

FARIA, A. F.; MARTINEZ, D. S. T.; BARBOSA, G. N. O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TOTOLA, M. R.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolated LSFM – 05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry, *Process Biochemistry*, 46, p. 1951-1957, 2011.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo, *Acta Scientiarum*, 32(1), p. 27-31, 2010.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. S.; SANTOS, A. F. A. B.; ARÁUJO, A. A.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R₁₄ against multidrug-resistant bacteria, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, p. 704-709, 2007.

FIELDS, P. R.; FRYER, P. J.; SLATER, N. K. H.; WOODS, G. P. Adsorptive Bubble Fractionation of Bacteria in a Bubble Fermenter, *The Chemical Engineering Journal*, 24, p. B3-B11, 1983.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. Ciência de espuma – aplicação na extinção de incêndios, *Química Nova*, 22 (1), p 126-130. , 1999.

FINNERTY, W. R. Biosurfactants in environmental Biotechnology, *Envrionmental Biotechnology*, 5, p. 291-295, 1994.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I. M. Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology. In: SEN, R. **Application of biological surface active compounds in remediation technologies**. Chap. 9, Berlin Heidelberg: Springer – Verlag, 2010.

FLORENCE, A. T.; ATWOOD, D. Tensoativos. In: ROTHSCHILD, Z.; ROTHSCHILD, A. M., 3 ed. **Princípios físico-químicos em farmácia**, Cap. 6, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.

GOMES, M. Z. V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove of individual and mixed cultures of food pathogenic bactéria, *Food Control*, 25, p. 441-447, 2012.

GRAU, A.; FERNANDEZ, J. C. G.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles, *BiochimicaetBiophysicActa*, 1418, p. 307-319, 1999.

GRIEVES, R. B. Foam Separation: A Review, *The Chemical Engineering Journal*, 9, p. 93-106, 1975.

HORNICK, C. A. Lipids I: Fatty Acids and Eicosanoids. In: BHAGAVAN, N .V. **Medical Biochemistry**. 4 ed., Chap. 18, Canada: Harcourt Academic Press, 2002.

ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M.; NAKAHARA, H.; SANO, Y.; ISHIGURO, R.; MATSUMOTO, M. Significance of β – sheet formation of micellization and surface adsorption of surfactin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, p. 341-348, 1995.

JOE, M. M.; BRADEEBA, K.; PARTHASARATHI, R.; SIVAKUMAAR, P. K.; CHAUHAN, P. S.; TIPAYNO, S.; BENSON, A.; AS, T. Development of surfactinbased nanoemulsion formulation from selected cooking oils: Evaluations for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, p. 172-180, 2012.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolated *Bacillus subtilis* 20B, *Bioresource Technology*, 99, p. 4603-4608, 2008.

KHALESI, M.; VENKEN, T.; DECKERS, S.; WINTERBURN, J.; SHOKRIBOUSJEIN, Z.; GEBRUERS, K.; VERACHTERT, H.; DELCOUR, J.; MARTIN, P.; DERDELINCKX, G. a novel method for hydrophobin extraction using CO₂ foam fractionation system, *Industrial Crops and Products*, 43, p. 372-377, 2013.

KARAKASHEV, S. I.; GROZDANOVA, M. V. Foams and antifoams, *Advances in Colloid and Interface Science*, 176-177, p. 1-17, 2012

KARGER, B. L.; DeVIVO, D. G. General Survey of Adsorptive Bubble Separation Process, *Separation Science*, 3 (5), p. 393-424, 1968.

KHAN, A. W. RAHMAN, M. S.; ZOHORA, U. S.; OKANA, M.; ANO, T. Production of surfactin using pentose carbohydrate by *Bacillus subtilis*, *Journal environmental Sciences*, 23, p. S63-S65, 2011.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84 (1), p. 41-46, 1997.

KIM, S. Y.; KIM, J. Y.; KIM, S. H.; BAE, H. J.; YI, H.; YOON, S. H.; KOO, B. S.; KWON, M.; CHO, J. Y.; LEE, C. E.; HONG, S. Surfactin from *Bacillissubtilis* displays anti-proliferative effects via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression, *Feb Letters*, 581, p. 865-871, 2007.

KOWN, B. T. The effects of Column height and diameter on the effectiveness of a continuous bubble fractionation system, *Water Research Pergamon Press*, 5, p. 93-102, 1971.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Elsevier Science*, 231 (1), p. 107-110, 1988.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. **Biosurfactants and biotechnology**. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. Surfactant Science series. Chap. 11, New York: Marcel Decker, 1987.

KRUGLYAKOV, P. M. Adsorption accumulation and separation of dissolved substances in dry foams, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, p. 382-391, 2010.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants), *Colloid & Interface Science*, 7, p. 12-20, 2002.

LEE, J. H.; NAM, S. H.; SEO, W. T.; YUN, H. D.; HONG, S. Y.; KIM, M. K.; CHO, K. M. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells, *Food Chemistry*, 131, p. 1347-1354, 2012.

LEMLICH, R. **Adsorptive bubble separation techniques**. New York and London: Academic Press, 1972.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M. Evaluation of emulsifier stability of biosurfactant produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT – 0913, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52 (2), 2009.

LINKE, D.; BERGER, R. G. Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes, *Journal Biotechnology*, 152, p. 125-131, 2011.

LI, X.; EVANS, G. M.; STEVENSON, P. Process intensification of foam fractionation by successive contraction and expansion, *Chemical engineering research and design*, 59, p. 2298-2308, 2011.

LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Production and characterization of a C₁₅ – surfactin – O – methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121, *Process Biochemistry*, 44, p. 1144-1151, 2009.

LUCENA, S. L. Efeito do refluxo externo no fracionamento de soluções diluídas de proteínas em colunas de bolhas e espuma. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, São Paulo, SP, Brasil, 1995.

MALYSA, K. Wet foams: Formation, Properties and Mechanism of Stability, *Advance in Colloids and Interfaces Science*, 40, p. 31-38, 1992.

MARUYAMA, H.; SEKI, H.; SUZUKI, A.; INOUE, N. Batch foam separation of a soluble protein, *Water Research*, 41, p. 710-718, 2007.

MERZ, J.; BURGHOFF, B.; ZORN, H.; SCHEMBECKER, G. Continuous foam fractionation: Performance as a function of operation variables, *Separations and Purification Technology*, 82, p. 10-18, 2011.

MILLER, R.; FAINERMAN, V. B.; LESER, M. E.; MICHEL, M. kinetics of adsorption of proteins and Surfactants, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, p. 350 – 356, 2004.

MYERS, D. **Adsorption**. Surface, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications. Chap. 9, New York: John Wiley & Sons, 1999.

MONTASTRUC, L.; TAO, L.; NIKOV, I.; FLOQUET, P.; DOMENECH, S. Integrated process for production of surfactin (III) modeling of adsorption Column, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19 (3), p. 357-365, 2011.

MORAES, I. L. Produção de Microrganismos. IN: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, 1 ed., Cap. 9, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEM, R. Towards commercial production of microbial surfactants, *Trends in Biotechnology*, 24 (11), p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N. Rhamnolipid Biosurfactante: Solubility and Environmental Issues. In: LETCHER, T. M. **Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues**. 1 ed., Chap. 15, Amsterdam: Elsevier, 2007.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants, *Environmental Pollution*, 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant – enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60, p. 371-380, 2001.

NAKABAYASHI, T.; TAKAKUSAGI, Y.; IWABATA, K.; SAKAGUCHI. Foam fractionation of protein: Correlation of protein adsorption onto bubbles with a pH-induced conformational transition, *Analytical Biochemistry*, 419, p. 173-179, 2011.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações, *Química Nova*, 25 (5), p. 772-776, 2002.

PARK, S. Y.; KIM, Y. H. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK – KB, MAPK and AKT pathway, *International Immunopharmacology*, 9, p. 886-893, 2009.

PERNA, R. F. Fracionamento de Surfactina em Coluna de Bolhas e Espuma. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, São Paulo, SP, Brasil, 2010.

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

PLOCINICZAK, M. P.; PLAZA, G. A.; SEGET, Z. P.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, p. 633 – 654, 2011.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum – contaminated soil, *Bioresource Technology*, 99, p. 1589-1595, 2008.

PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 19, p.217-242, 1993.

QU, Y-H.; ZEN, G-M.; HUANG, J-H.; XU, K.; FANG, Y-Y.; LI, X.; LIU, H-L. Recovery of surfactant SDS and CD_{2+} from permeate in MEUF using a continuous foam fractionator, *Journal of Hazardous Materials*, 155, p. 32-38, 2008.

RAAIJMAKERS, J. M.; BUIJIN, I.; KOCK, J. D. Cyclic lipopeptide production by plant – associated *Pseudomonas spp.*: diversity, activity, biosynthesis, and regulation, *Ame Phytopatology Soc*, 19 (7), p. 699-710, 2006.

ROSA, P.T.V.; SANTANA, C.C.; CARBONELL, R.G. Determination of the liquid pool surfactant and protein concentration for semi-batch foam fractionation columns. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 24 (1), p.1-14, 2007.

ROSA, P. T. V. Fracionamento de proteínas e outros tensoativos em coluna de bolhas e espuma, Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, São Paulo, SP, Brasil, 1996.

ROSSO, D.; HUO, D. L.; STENSTROM, M. K. Effects of interfacial surfactant contamination on bubble gas transfer, *Chemical Engineering Science*, 61, p. 5500-5514, 2006.

RUJIRAWANICH, V.; CHUYINGSAKULTIP, N.; TRIROJ, M.; MALAKUL, P.; CHAVADEJ, S. Recovery of surfactant from an aqueous solution using continuous multistage foam fractionation: Influence of design parameters, *Chemical Engineering and Processing*, 52, p. 41-46, 2012.

SALEH, Z. S.; HOSSAIN, M. D. A study of the separation of proteins from multicomponent mixtures by a semi-batch foaming process, *Chemical Engineering and Processing*, 40, p. 371-378, 2001.

SARACHAT, T.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Purification and concentration of a Rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation, *Bioresource Technology*, 101, p. 324-330, 2010.

SANTANA, C. C.; DU, L.; TANNER, R. D. Downstream processing of proteins using foam fractionation. *Biotechnology Encyclopedia of Life Support System*, 2003.

SCHNEPF, R.W.; GADEN Jr., E.L.; MIROCZNIK, E.; SCHONFELD, E. Foam fractionation: metals, *Chemical Engineering Progress*, 55 (5), p. 42-46, 1959.

SINGH, A.; HAMME, J. D. V.; WARD, O. P. Surfactants in Microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, *Biotechnology Advances*, 25, p. 99-121, 2007.

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review, *Journal of Food Engineering*, 105, p. 1-27, 2011.

SULLIVAN, E. Molecular Genetics of Biosurfactant Production, *Current Opinion in Biotechnology*, 9, p. 263-269, 1998.

VANHOUTE, M.; FROIDEVAUX, R.; PIERLOT, C.; KRIER, F.; AUBRY, J. M.; GUILLOCHON, D. Advancement of foam separation of bioactive peptides using an aeration column with a bubbling – draining method, *Separation and Purification Technology*, 63, p. 460 – 465, 2008.

VALSARAJ, K. T.; TOMA, G. J.; THIHODEAUX, L. J. Nonfoaming adsorptive bubble separation process, *Separation Technology*, 1, p. 234-244, 1991.

VO, H. S.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The enhancement of foam generated by low power ultrasound and its application to foam fractionation, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 380, p. 35-40, 2011.

THOMAS, A.; WINKLER, M. A. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. In: Wiseman, A.; John Wiley and Sons. **Foam separation of biological materials**, 1 ed. , *Chap. III*, 1977.

WASAN, D.T.; NIKOLOV, A.D.; LOBO, L.A.; KOCZO, K.; EDWARDS, D.A. Foams, thin films and surface rheological properties, *Progress in Surface Science*, 39, p.119-154, 1992.

WHANG, L - M.; LIU, P - W. G.; MA, C - C.; CHEN, S - S. Application of biosurfactants, rhamnolipid and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel – contaminated water and soil, *Journal of Hazardous materials*, 151, p. 155-163, 2008.

WINTERBURN, J. B.; RUSSEL, A. B.; MARTIN, P. J. Integrated recirculating foam fractionation for the continuous recovery of biosurfactant from fermenters, *Biochemical Engineering Journal*, 54, p. 132 – 139, 2011.

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y, YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil – containing wastewater, *Process Biochemistry*, 44, p. 302 – 308, 2009.

ZHAO, C.; ZU, Y.; LI, C. Extraction of solanesol from tobacco (*Nicotianatobaccum L.*) leaves by bubble column, *Chemical Engineering and Processing*, 48, p. 203-208, 2009.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; LAZARIDIS, N. K.; GOLYSHIN, P. N. The use of biosurfactant in flotation applications for the removal of metal ions, *Minerals Engineering*, 16, p. 1231-1236, 2003.

8 APÊNDICE

Apêndice A: Curva analítica da surfactina padrão

Para obtenção da curva analítica da surfactina padrão foram determinadas concentrações de surfactina a partir do método da placa. Na Tabela 8.1 são apresentados os dados utilizados para a obtenção da curva analítica.

Tabela 8.1. Curva de calibração para determinação da concentração de surfactina através de medidas de tensão superficial.

C (mg/L)	C (mol/mL)	C (mol/cm ³)	Tensão superficial (mN/m)
1	9,65251E-10	-20,76	64,415
2	1,9305E-9	-20,07	63,330
4	3,861E-9	-19,37	56,788
6	5,79151E-9	-18,97	54,115
8	7,72201E-9	-18,68	49,024
12	1,1583E-8	-18,27	47,575
16	1,5444E-8	-17,99	41,994
20	1,9005E-8	-17,76	38,844

Dado: C - Concentração

Obtendo-se assim a curva de calibração (Figura 8.1) através da tensão superficial (mN/m) versus Ln C (mol/cm³).

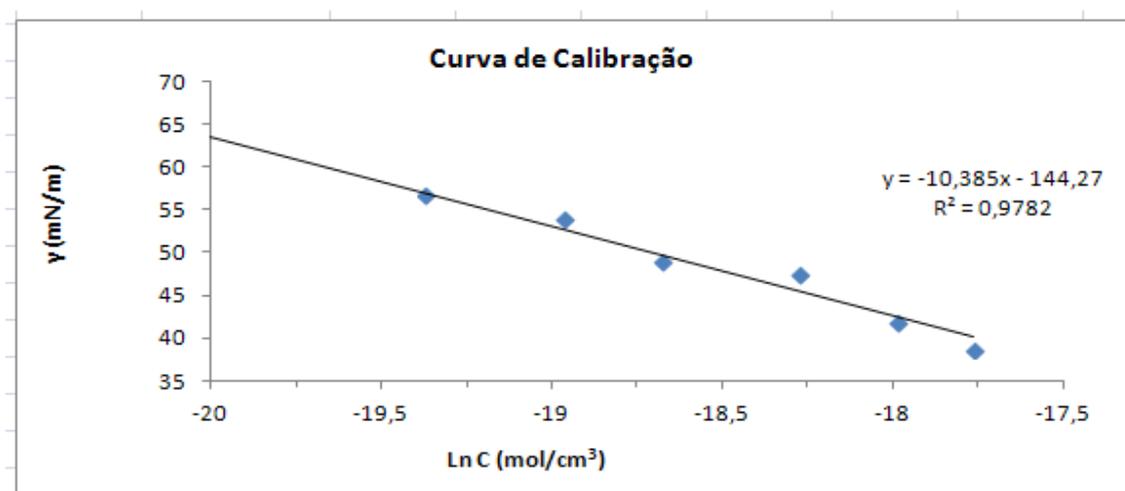


Figura 8.1: Curva de calibração da surfactina padrão

A curva analítica da surfactina padrão foi dada por:

$$\begin{aligned}\gamma &= -10,385x - 144,27 \\ R^2 &= 0,9782\end{aligned}\tag{6}$$

Onde: γ e representa a tensão superficial (em mN/m).