

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO INTEGRADA DE SURFACTINA A
PARTIR DE *Bacillus* sp ITP-001 EM FRACIONAMENTO COM ESPUMA EM
SEMI- BATELADA**

Autor: Maíra Taynara Santos da Silva

Orientadores: Prof. Dr. César Costapinto Santana

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2013

PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO INTEGRADA DE SURFACTINA A PARTIR DE
Bacillus sp ITP-001 EM FRACIONAMENTO COM ESPUMA EM SEMI- BATELADA

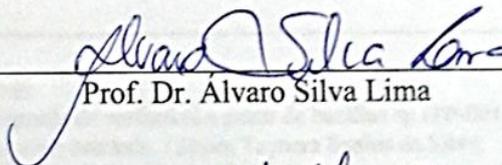
Maíra Taynara Santos da Silva

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

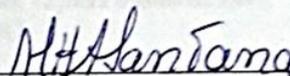
Aprovada por:



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana



Prof. Dr. Alvaro Silva Lima



Prof.^a. Dr.^a. Maria-Helena Andrade Santana I



Prof.^a. Dr.^a. Cleide Mara Faria Soares

ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2013

S586p

Silva, Maíra Taynara Santos da
Produção e concentração integrada de surfactina a partir de bacillus sp ITP-001 em
fracionamento com espuma em semi-batelada. / Maira Taynara Santos da Silva;
orientador: Cesar Costapinto Santana. – Aracaju, 2013.

79 p. : il. ;
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo). – Universidade Tiradentes,
2013.

1. Bacillus ITP-001. 2.Surfactina.3.Fracionamento com espuma. 4. Biorreator
integrado. I. Santana, Cesar Costapinto (orient.). II. Universidade Tiradentes. III.
Título.

CDU: 542

Agradecimentos

Enfim passaram-se dois anos..E mais um ciclo da minha vida está a se fechar.

Diante de tudo que vivi e o que essa experiência me trouxe e me trará quero agradecer a Deus pelas bênçãos concedidas e pela força que me fez superar diversas dificuldades durante esse período, o que me serviram para demonstrar que posso chegar cada vez mais além.

Agradeço a orientação, a oportunidade de crescimento e todo incentivo dos Professores Álvaro Silva Lima e Cesar Costapinto Santana. Meu Muito obrigada!!

Quero a agradecer a TODA minha família que acreditaram em mim e no meu potencial. Por entender toda minha ausência por varias vezes em casa e nas reuniões familiares, por conta dos meus experimentos nos finais de semana. Minha mãe e irmãos que mesmo de longe sempre me deram a maior força. Por ouvirem todas as minhas lamentações, em especial minha Tia Du (um suporte durante esses dois anos, tanto psicológico como físico). A Marcia, Raimundo que me concederam sua residência por vários e vários dias, nos quais eu não podia ir pra casa. Muito agradecida!!

Não posso esquecer dos meus amigos do Programa de mestrado em Engenharia de Processo, aqueles que entraram comigo: Fabi, Roberto, Verusca, Bruno, Jaci, Fernadinho, Ana Claudia, Glacia, Lays, Lucas, Denisson, Douglas, Aiala, Marcos, Anderson, Oscar que apesar de não termos todo tempo, os encontros sempre foram composto de palavras de apoio uns com os outros, nos levando a laços cada mais fortes. Sem esquecer das minhas quase melhores amigas Acenini, Vanessa, que me acolheram e me suportaram mais de perto. Agradeço a todos!

Ainda tem aqueles que conheci nesse caminho no ITP como Matheus e Samuel Freitas que me ajudaram muito no inicio dessa jornada, Nay, Rone, Eli, Mateus, Bruna, , Samuel Bruno, etc..

Meus amigos de longas datas que estiveram torcendo por mim desde o inicio (Ary, Midi, Luiza, Je, Poly), que represento aqui por Dani, que esteve ao meu lado todo esse tempo, compartilhando de todas as minhas angustias, alegrias, tristezas e se fazendo a melhor companhia quando mais precisei.

É..olho pra trás e vejo que apesar dos pesares, eu consegui construir muita coisa nesses rápido e demorados 2 anos..E chego a me sentir orgulhosa. Assim, como dizia Almir Sater: “Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si, carrega o dom de ser capaz e ser feliz..”

A imaginação é mais importante que o conhecimento.

Albert Einstein

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

PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO INTEGRADA DE SURFACTINA A PARTIR DE
Bacillus sp ITP-001 EM FRACIONAMENTO COM ESPUMA EM SEMI-
BATELADA

Maíra Taynara Santos da Silva

Fracionamento de espuma, um método de separação com base na aquisição de concentração em excesso na superfície de compostos superfície ativa, foi utilizado para a concentração de surfactina a partir de um caldo de fermentação. O biosurfactante foi produzido numa cultura de *Bacillus* sp ITP-001 e o biorreator foi integrado a uma coluna de fracionamento tendo em vista a economia nas etapas de purificação do produto. A produção de taxa de espuma controlada foi uma consequência de taxas de aeração e agitação fixadas. Um modelo de planejamento experimental do tipo 2² foi utilizado nos experimentos realizados. O valor máximo da concentração de surfactina (4,5 g/L) foi adquirido na operação com valores mínimos de taxas de aeração e agitação (200 rpm e 1,0 vvm). O enriquecimento médio de surfactina nestas condições de operação alcançou o valor de 28 e a recuperação foi de 94 %. A integração do bioreactor e o dispositivo de separação foi demonstrado ser um método simples e prático para a concentração de surfactina usando uma cultura de *Bacillus* sp ITP-001 para o meio de produção. Ensaios de atividade antimicrobiana e atividade de emulsificação indicaram que a surfactina produzida é um poderoso agente antimicrobiano e emulsificante. Este composto tem ação de inibir vários microorganismos patogênicos (*E. coli*, *C. albicans*, *Fusarium* sp). O biosurfactante também apresentou propriedades emulsionantes diferentes para óleos vegetais e hidrocarbonetos em solução óleo-água, ocorrendo o maior valor de estabilidade emulsificante com óleos vegetais.

Palavras-chave: *Bacillus* ITP-001, surfactina, fracionamento com espuma, biorreator integrado.

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

INTEGRAL PRODUCTION AND CONCENTRATION OF SURFACTIN FROM
Bacillus SP ITP-001 BY SEMI-BATCH FOAM FRACTIONATION

Maíra Taynara Santos da Silva

Foam fractionation, a separation method based on the acquisition of surface concentration excess for active-surface compounds, was used for the concentration of surfactin from a fermentation broth. The biosurfactant was produced in a culture of *Bacillus* sp ITP-001 and the bioreactor was integrated to a fractionation column aiming at the saving of steps in the purification of the product. The production of foam controlled rates formation was a consequence of fixed aeration and agitation rates. An experimental planning desing method of type 2² was used in the experiments set up. The maximum value of surfactin concentration (4.5 gL⁻¹) was acquired in the operation with minimum values of aeration and agitation rates (200 rpm and 1.0 vvm). The averague surfactin enrichment in theses operation conditions reached the value of 28 and the mass recovery 94 %. The integration of the bioreactor and the separation device was demonstrated as a simple and practical method for surfactin concentration using *Bacillus* sp ITP-001 as a production method. Essays of antimicrobial and emulsification activity indicated that the produced surfactin is a powerful antimicrobial and emulsifier agent. This compound has activity against several pathogenic microorganisms (*E. coli*, *C. albicans*, *Fusarium* sp). The biosurfactant presented different emulsifier properties for vegetable oil and hidrocarbons in water-oil solution, the values highest of emulsifier stability occurring with vegetable oils.

Keywords: *Bacillus* ITP-001, Surfactin, Foam fractionation, Integrated bioreactor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 SURFACTANTES	4
3.2 BIOSURFACTANTES.....	8
3.2.1 <i>Surfactina</i>	12
3.2.1.1 <i>Aplicações potenciais</i>	15
3.4 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO	17
3.5 FENOMENOS DE ADSORÇÃO DE TENSOATIVOS NA INTERFACE GÁS-LÍQUIDO	19
3.5.1 <i>Lei de adsorção de Gibbs</i>	19
3.5.2 <i>Isoterma de adsorção de Langmuir</i>	20
3.5.3 <i>Processo de separação em coluna de espuma</i>	21
3.6 FORMAÇÃO E LEITO DE ESPUMA	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 SURFACTINA	28
4.2 CURVA ANALÍTICA DE SURFACTINA	28
4.3 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTURA	28
4.4 PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO INTEGRADA DE SURFACTINA	29
4.4.1 <i>Planejamento experimental</i>	29
4.4.2 <i>Aparato experimental</i>	30
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	31
4.5.1 <i>Concentração de massa celular seca</i>	31
4.5.2 <i>Concentração de Amido</i>	31
4.5.3 <i>Concentração de Proteínas</i>	31
4.5.4 <i>Concentração de glicose</i>	31
4.5.5 <i>Determinação da concentração de surfactina</i>	32
4.5.6 <i>Recuperação e enriquecimento de surfactina</i>	33
4.6 PARÂMETROS CINÉTICOS	33
4.7 CARACTERIZAÇÃO	34
4.7.1 <i>Atividade antimicrobiana</i>	34
4.7.2 <i>Atividade e estabilidade emulsificante</i>	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 EFEITO DAS TAXAS DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA	36
5.2 INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO SISTEMA INTEGRADO	39
5.3 INFLUENCIA DAS VARIÁVEIS NOS VALORES DE RECUPERAÇÃO E ENRIQUECIMENTO	45

5.4 ESTUDO DO EFEITO CINÉTICO NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA	46
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS</i> SP ITP-001	48
5.5.1 Atividade antimicrobiana.....	48
5.5.2 Atividade emulsificante.....	51
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXOS	67
8.1 CURVA PADRÃO DE SURFACTINA	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1: REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE SURFACTANTE.....	4
FIGURA 3.2: TENSÃO SUPERFICIAL, TENSÃO INTERFACIAL E SOLUBILIZAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE.....	5
FIGURA 3.3: DIVERSAS POTENCIALIDADES DOS SURFACTANTES.....	8
FIGURA 3.4: ESTRUTURA DA PRINCIPAL ISOFORMA DA SURFACTINA. OS AMINOÁCIDOS (A), (D) E (E) CORRESPONDEM AO ÁCIDO GLUTÂMICO, VALINA E ÁCIDO ASPÁRTICO, RESPECTIVAMENTE; (B), (C), (F) E (G) CORRESPONDEM AO AMINOÁCIDO LEUCINA; (H) CORRESPONDE AO ÁCIDO GRAXO 3-HIDRÓXI-13 METIL-TETRADECANÓICO.....	14
FIGURA 3.5: (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).	20
FIGURA 3.6: FENÔMENO QUE OCORRE DURANTE O FRACIONAMENTO COM ESPUMAS.....	21
FIGURA 3.7: ESTUDO DA RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA. (A) APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NOS ESTUDOS DE FRACIONAMENTO DE SURFACTINA COM ESPUMA; (B) APARATO EXPERIMENTAL (SISTEMA INTEGRADO) UTILIZADO DURANTE OS ESTUDOS DE PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO SIMULTÂNEA DE SURFACTINA	23
FIGURA 3.8: REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS BOLHAS DE ESPUMA.....	24
FIGURA 3.9: ESTRUTURA DE UMA ESPUMA CONSTITUÍDA POR UMA FASE GASOSA E UMA FASE LÍQUIDA (FILMES E CANAIS DE PLATEAU).....	25
FIGURA 3.10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DRENAGEM DO FILME PARA OS CANAIS DE PLATEAU (EFEITO GIBBS MARANGONI).....	26
FIGURA 4.1: APARATO EXPERIMENTAL (SISTEMA INTEGRADO) UTILIZADO DURANTE OS ESTUDOS DE PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO SIMULTÂNEA DE SURFACTINA	31
FIGURA 5.1: DIAGRAMA DE PARETO MOSTRANDO A CONTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA A CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA	38
FIGURA 5.2: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA E FUNÇÃO DAS TAXAS DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO.	39
FIGURA 5.3: CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA E NO BIOREATOR COM O TEMPO NAS CONDIÇÕES DE 200RPM E 1,0VVM..	40
FIGURA 5.4: CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA E NO BIOREATOR COM O TEMPO NAS CONDIÇÕES DE 200RPM E 2,0VVM..	41

FIGURA 5.5: CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA E NO BIOREATOR COM O TEMPO NAS CONDIÇÕES DE 400RPM E 2,0VVM..	42
FIGURA 5.6: CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA E NO BIOREATOR COM O TEMPO NAS CONDIÇÕES DE 400RPM E 1,0VVM..	42
FIGURA 5.7: VOLUME DE LÍQUIDO COLETADO NA FASE ESPUMA POR HORA PARA TODAS AS CONDIÇÕES ESTUDADAS	44
FIGURA 5.8: PERFIL DE ACUMULO DE BIOMASSA, CONSUMO DE AMIDO E CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA EM SISTEMA INTEGRADO PARA CULTURA DE BACILLUS SP ITP-001.	47
FIGURA 5.9: HALO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE SURFACTINA PARA CANDIDA ALBICANS ATCC-76645..	50
FIGURA 5.10: ESTABILIDADE EMULSIFICANTE DA SURFACTINA PRODUZIDA POR BACILLUS SP. ITP-001 EM EMULSÃO ÁGUA-ÓLEO DE DIFERENTES ÓLEOS A 25°C E PH 7,0.	52
FIGURA 5.11: ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA PELA SURFACTINA A PARTIR DO BACILLUS SP ITP-001 EM PH 7,0 E 25°C PARA ÓLEOS VEGETAIS.	53
FIGURA 5.12: ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA PELA SURFACTINA A PARTIR DO BACILLUS SP ITP-001 EM PH 7,0 E 25°C PARA ÓLEOS MINERAIS.	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: VALORES DE HLB (TENSOATIVOS NÃO-IÔNICOS) SALIENTANDO APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS.....	6
TABELA 3.2: SURFACTANTES COM SUAS RESPECTIVAS CLASSES E FÓRMULAS QUÍMICAS.....	7
TABELA 3.3: PRINCIPAIS CLASSES DE BIOSURFACTANTES E MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS.....	10
TABELA 3.4: PRINCIPAIS APLICAÇÕES COMERCIAIS DOS BIOSURFACTANTES.....	11
TABELA 4.1: VARIÁVEIS AVALIADAS COM SEUS RESPECTIVOS NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	29
TABELA 4.2: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COM REPLICATA NO PONTO CENTRAL.....	29
TABELA 5.1: EFEITO DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA PRODUZIDA POR BACILLUS SP ITP-001 EM SISTEMA INTEGRADO.....	36
TABELA 5.2: ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NA ESPUMA.....	37
TABELA 5.3: MEDIA DE VOLUME COLETADO NA FASE ESPUMA E MASSA TOTAL DE SUFACTINA RECUPERADA NA FASE ESPUMA.....	39
TABELA 5.4: VALORES DE RECUPERAÇÃO E ENRIQUECIMENTO OBTIDOS PARA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA NO SISTEMA INTEGRADO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	45
TABELA 5.5: EFEITO ANTIMICROBIANO DE AMOSTRA DE SURFACTINA PRODUZIDA POR CULTURA DO BACILLUS SP ITP-001 RECOLHIDOS EM ESPUMA DE FASE NA CONDIÇÃO 200 RPM E 1,0 VVM.....	49
TABELA 5.6: ATIVIDADE EMULSIFICANTE DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO PELA CULTURA DE BACILLUS SP ITP-001 PARA DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS E MINERAIS À 25°C E PH 7,0.....	51
TABELA 5.7: COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS.....	54
TABELA 8.1: CURVA ANALÍTICA DE CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA EM FUNÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL.....	67

1. INTRODUÇÃO

O setor industrial, nas mais diferentes vertentes, tem apresentado um intenso crescimento na utilização de tecnologias limpas. Tanto as indústrias de alimentos como as de cosméticos, farmacêuticas, produtos de limpeza e petróleo, requerem o emprego cada vez maior de compostos de superfície ativa, os chamados surfactantes, devido a sua habilidade de reduzir tensão superficial entre fases imiscíveis, atribuído a sua característica de molécula anfifílica. No entanto, a grande maioria dos compostos disponíveis comercialmente, é sintetizada quimicamente a partir de derivados do petróleo. Em função disso e da crescente preocupação com o meio ambiente, surgiu a necessidade de buscar uma alternativa à substituição dos surfactantes sintéticos, que apresente propriedades semelhantes, menor toxicidade, alta biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica, como os surfactantes de origem microbiológica, designados biosurfactantes (YEH et al., 2006).

Diversos tipos de micro-organismos têm sido empregados para a produção dos biosurfactantes. Os gêneros de *Bacillus* tem se destacado por sintetizar um dos mais estudados e efetivos compostos de superfície, a surfactina. Esse composto pertence à classe dos lipopeptídeos e vem se destacando devido a sua capacidade de reduzir tensões superficiais em concentrações mínimas. Além disso, o grande interesse por esse biosurfactante é atribuído a sua estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e força iônica, potencial de formação de emulsões estáveis e características antibióticas.

Entretanto, a produção de biosurfactantes é atualmente incapaz de competir em nível econômico com os compostos produzidos por síntese química, devido aos elevados custos de produção, ligados principalmente a processos *downstream*. Esses biosurfactantes, geralmente, estão presentes no meio de produção como solutos altamente diluídos, o que de fato, dificulta sua recuperação. Métodos convencionais de recuperação como precipitação ácida, extração com solvente e cristalização, além de não serem eficientes para soluções diluídas, são demorados e requerem o emprego de solventes, o que os tornam inconvenientes, pois influenciam no custo do processo.

Para que haja viabilidade na obtenção de biosurfactantes, é necessário o emprego de técnicas ou métodos de recuperação de fácil manuseio, baixo custo e alta eficiência. Técnicas de separação baseadas na adsorção de compostos na superfície de bolhas têm sido reportadas, destacando características atrativas para concentrar e recuperar bioprodutos em soluções diluídas (SANTANA, 1994). Dentre estas técnicas,

o fracionamento com espuma, que enriquece as soluções de surfactantes pela adsorção na interface gás-líquido, vem sendo empregada.

Muitos trabalhos reportam a recuperação de bioprodutos através de técnicas de adsorção por simples processo fracionamento em coluna de bolhas e espumas. No entanto, trabalhos com a integração da técnica de fracionamento com espuma junto ao meio de produção são extremamente raros quando se diz respeito à recuperação de compostos de superfície ativa. A utilização de colunas de separação integrada ao meio de produção permite que a espuma proveniente da fermentação se eleve axialmente, resultando na concentração do produto de interesse ao longo da coluna, devido a processos de adsorção e drenagem.

Entretanto, poucos estudos são voltados à recuperação integrada ao meio de produção, por isso, surgiu à necessidade de desenvolver estratégias que visassem produzir e concentrar um composto de alto valor como a surfactina, simultaneamente, o que seria a melhor alternativa de simplificar o gerenciamento do processo e reduzir custos, pelo fato da formação de espuma ser um problema comum em fermentações onde compostos de superfície ativa são produzidos. Além disso, seria desnecessária a utilização de agentes antiespumantes, que além de dispendiosos, podem reduzir a taxa de transferência de oxigênio e causar efeitos adversos na fisiologia da célula, gerando um efeito negativo na produção.

Neste trabalho, foi utilizada a cepa *Bacillus* sp ITP-001, que tem procedência do laboratório de Engenharia de Bioprocessos do ITP (Instituto de Tecnologia e Pesquisa) e atualmente estudada para diversas aplicações. Dentre as diferentes finalidades, neste estudo avaliou-se a eficiência na produção do biosurfactante de interesse, a surfactina, já que alguns trabalhos vem reportando que esse composto é geralmente sintetizados por várias cepas do gênero de *Bacillus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo da produção e concentração de surfactina, por fermentação submersa utilizando *Bacillus* sp ITP-001 em bioreator agitado/aerado integrado ao processo de fracionamento em coluna de espuma operado a diferentes condições.

2,2 Objetivos específicos

Os objetivos deste trabalho foram:

- (i) Estudar diferentes condições de operação do sistema integrado (biorreator + coluna de fracionamento) por meio de um planejamento experimental 2^2 com três pontos centrais, para determinar as condições em que maior concentração de surfactina é alcançada;
- (ii) Obter dados de recuperação e o enriquecimento em sistema integrado;
- (iii) Averiguar as características do biosurfactante com relação às atividades antimicrobiana e emulsificante;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Surfactantes ‘

Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão “*surface active agent*”, termo que significa, literalmente, agente com atividade superficial. Em outras palavras, surfactante é um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. O termo interface denota o limite entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície indica que uma das fases é gasosa (BARROS *et al.*, 2007). Os surfactantes, também chamados de tensoativos, emulsificantes ou agentes de interface, são moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Ao acumular-se na interface entre as fases imiscíveis, tais como óleo/água, água/óleo ou ar/água, pode reduzir as tensões superficiais e interfaciais (GHOJAVAND *et al.*, 2008, DESAI e BANAT, 1997). Na Figura 3.1 pode-se observar a parte hidrofílica (polar) que é composta por grupos iônicos (aniônicos ou catiônicos), não-iônicos ou anfotéricos (anfotéricos), e está orientada para o interior da solução, já a porção hidrofóbica (apolar) é constituída geralmente por um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada, apresentando ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos, concentrando-se na superfície voltada a fase hidrofóbica (DESAI e BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005).

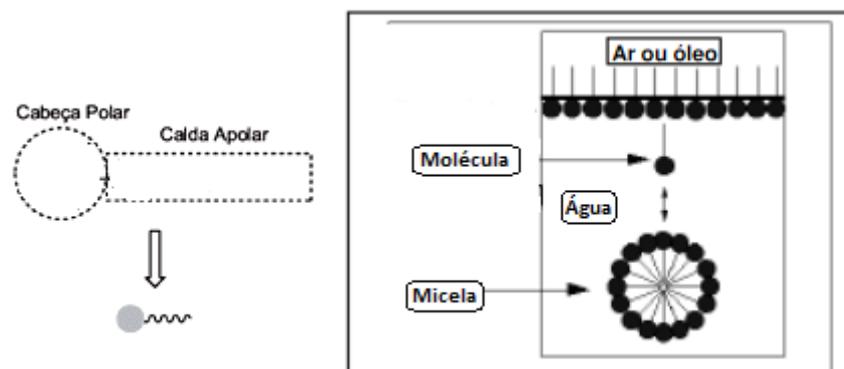


Figura 3.1. Representação da molécula de surfactante. Fonte: Adaptado Evans *et al.* (1997).

A formação do filme molecular, ordenado nas interfaces, que reduz as tensões e comanda as propriedades reológicas e de transferência de massa é responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (CHEN e JUANG, 2008a).

Uma propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados, chamados micelas que, geralmente, se formam à baixas concentrações em água (MYERS, 1988; HOLMBERG, 2001; BANAT *et al.*, 2010). A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), a que corresponde a uma das mais importantes características de um surfactante, pois tensoativos eficientes têm uma baixa concentração micelar crítica (ou seja, menos surfactante é necessário para diminuir a tensão superficial) (MULLIGAN, 2005). Na prática, CMC é também conhecida como concentração máxima de monômeros de surfactante na água, e está influenciada pelas condições de pH, temperatura e força iônica (DAVIS *et al.*, 1999). Quando a concentração do biosurfactante próximo da CMC observa-se um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas. Entretanto, abaixo da CMC o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros (MANIASSO, 2001; REIS, 2007). Em concentrações acima da CMC, onde predominam as micelas, há um aumento da solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa, devido à incorporação do composto orgânico no interior da micela (BUENO, 2008). Além da CMC, outros parâmetros, tais como solubilidade, tensão superficial e tensão interfacial, variam em função da concentração do surfactante (Figura 3.2) (MULLIGAN, 2005).

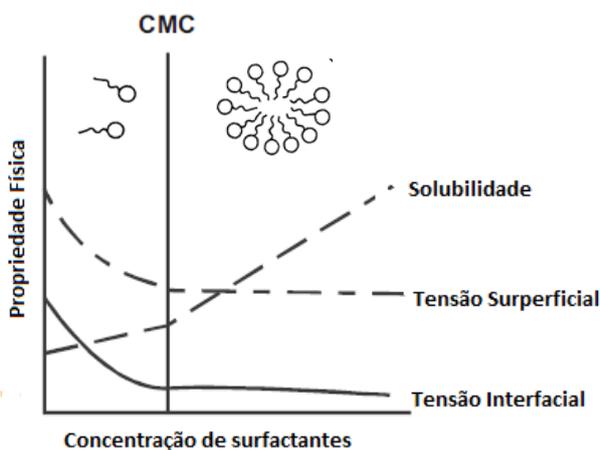


Figura 3.2. Tensão Superficial, tensão interfacial e solubilização em função da concentração do surfactante. Fonte: MULLIGAN (2005)

A eficácia de um surfactante é determinada pela sua capacidade de diminuir a tensão superficial, que é uma medida da energia superficial livre (entalpia da superfície livre) por unidade de área requerida para trazer a molécula para a superfície,

ou seja, a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial. Devido à presença de um surfactante, menos trabalho é necessário para trazer uma molécula para a superfície e a tensão superficial é reduzida (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; MULLIGAN, 2005).

Outra característica importante dos surfactantes está relacionada à abundância relativa das frações polares e apolares. Os surfactantes podem ser classificados de acordo com o balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB), o qual afeta as propriedades físico-químicas das moléculas. O valor de HLB é uma indicação da solubilidade no óleo ou na água da solução e, quanto menor o valor de HLB maior é a solubilidade no óleo da solução. Em geral, as moléculas com baixo HLB são lipofílicas, enquanto as de HLB alto são mais solúveis em água. Geralmente, surfactantes com valores de HLB menores que 6 (seis) são mais solúveis na fase hidrofóbica, enquanto que os surfactantes com valores de HLB entre 10 (dez) e 18 (dezoito) são altamente hidrofílicos (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; DESAI e BANAT, 1997; LIN, 1996). A Tabela 3.1 apresenta o emprego de surfactantes de acordo com os valores de HLB.

Tabela 3.1. Valores de HLB (tensoativos não-iônicos) salientando aplicações tecnológicas.

HLB	Aplicação
0-3	Antiespumante
2-8	Emulsionates A/O
7-9	Formadores de gel
8-18	Emulsão O/A
13-15	Detergentes
15-20	Solubilizantes

Fonte: Tadros, 2005

As propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais que envolvem: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BANAT *et al.*, 2000).

Dentre essas diversas aplicações, os surfactantes de modo geral são classificados de acordo com a natureza do grupamento hidrofílico como: iônicos (aniônicos e catiônicos), não-iônicos ou neutros e zwitteriônicos e são apresentados na Tabela 3.2 (FLORENCE e ATWOOD, 2003). Os mais comuns dos surfactantes não-

iônicos são etoxilatos, copolímeros de óxido de etileno e propileno e ésteres de sorbitano. Exemplos de surfactantes iônicos comercialmente disponíveis incluem ácidos graxos, sulfonatos ou sulfatos de éster (aniônico) e sais quartenário de amônio (catiônico) (BANAT *et al.*, 2000).

Tabela 3.2. Surfactantes com suas respectivas classes e fórmulas químicas.

Classificação dos surfactantes	Fórmula química
Aniônicos	
Dodecanato de sódio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-\text{Na}^+$
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$
Dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$
Catiônicos	
Cloreto de tetradeciltrimetilamônio (TTACl)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
Cloreto de tetradecilbenzildimetilamônio (TBzCl)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{Cl}^-$
Não-iônicos	
Éter 1,1,3,3-tetrametil-butyl-fenil (9,5) – poli-oxietilênico (Triton X-100)®	$\text{C}_8\text{H}_{17}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{10}\text{OH}$
Monohexadecil éter de heptaoxietileno	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{OH}$
Zwitteriônicos	
N-dodecil-N,N-dimetil-betaína	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
3-(N-dodecil-N,N-dimetilamônio)-propano-1-sulfonato	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$

Fonte: Florence e Atwood, 2003; Reis, 2007.

Os surfactantes iônicos e não-iônicos correspondem aos grupos de maior consumo. Os surfactantes catiônicos são utilizados na indústria têxtil e de fertilizantes, no revestimento de estradas (asfalto), como amaciantes de roupas e condicionadores de cabelos. Os aniônicos podem ser aplicados em cosméticos, shampoos, desinfetantes e em detergentes de uso doméstico. Por outro lado, os surfactantes não iônicos estão presentes em defensivos agrícolas, no tratamento de metais e na indústria petrolífera, enquanto que os zwitteriônicos são utilizados em produtos de higiene pessoal (sabonete líquido e géis), em espuma para controle de incêndio, na limpeza industrial e de automóveis (Figura 3.3) (PERNA, 2010).

Barros *et al.* (2007) e Nitschke e Pastore (2002) em seus estudos relatam que a maior utilização dos surfactantes concentra-se nas indústrias de cosméticos e de produtos de higiene para a produção de hidratantes, sabonetes e produtos de

maquiagem; na indústria de produtos de limpeza, empregado nas formulações de sabões e detergentes, na indústria alimentícia, utilizado como aditivos em condimentos, e na indústria petrolífera, sendo aplicado na dispersão no derramamento de óleos e limpezas de reservatórios de óleos.



Figura 3.3. Diversas potencialidades dos surfactantes.

Dessa forma, estudos revelam que os surfactantes são uma importante classe de produtos químicos com o alto volume de uso. Segundo van Bogaerb (2007) a produção de surfactantes foi estimada em 2007 para ser em torno de 10 milhões de toneladas/ano. Sabe-se que a maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, o interesse por surfactantes de origem microbiana tem aumentado significativamente em decorrência de serem naturalmente biodegradáveis diminuindo assim o impacto ambiental, podem ocorrer naturalmente no solo, além de possuírem propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos e poderem assim ser aplicados em diferentes setores industriais (MAKKAR *et al.*, 2011; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; BANAT *et al.*, 2000).

3.2 Biosurfactantes

Uma grande variedade de micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de produzir um amplo espectro de produtos com propriedades de superfície ativa, contudo, o principal produtor são as bactérias (AMANI *et al.*, 2010; NAJAFI *et al.*, 2010). Esses compostos de origem microbiana que exibem atividade superficial são denominados biosurfactantes, os quais são subprodutos de seus respectivos sistemas metabólicos (CAMETROA e MAKKAR, 2004). DAVIS *et al.* (1999) em seus estudos já mencionavam interesse centrado em surfactantes naturais, como fonte alternativa de surfactantes químicos.

A maioria dos surfactantes microbianos são moléculas complexas, sendo composto de lipídeos, fosfolipídeos, polisacarídeos, proteínas e outras macromoléculas biológicas que contém vários grupos funcionais incluindo, carboxílicos, amino e fosfato (NAJAFI *et al.*, 2010; DESAI e BANAT,1997).

A classificação dos surfactantes sintéticos tem como base os grupamentos polares (hidrofílicos), já os biosurfactantes são classificados com base na natureza bioquímica do composto e pela sua origem microbiana (NAJAFI *et al.*, 2010). Podem ser classificados em cinco categorias, glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeo neutro (como os ácidos ustilágico e corinomicólico), além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Tabela 3.3). Dentre estas classes os glicolipídeos e os lipopeptídeos são os biosurfactantes mais comumente isolados, no qual este último é o mais efetivo dos compostos estudados (SOBRINHO *et al.*, 2008; NITSCHKE e PASTORE, 2006).

Os biosurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato. A maioria dos biosurfactantes são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. Essas características estruturais dos biosurfactantes os tornam similares aos surfactantes sintéticos (BOGNOLO, 1999; NITSCHKE e PASTORE, 2002). Dentre os compostos de superfície ativa, os de baixa massa molar ou biosurfactantes tem o poder de reduzir a tensão superficial nas interfaces ar/água e a tensão interfacial entre óleo/água, considerando que os de alta massa molecular, são os biosurfactantes denominados de bioemulsificantes, pois são mais eficazes na estabilização de emulsões óleo/água (BANAT *et al.*, 2010; CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

Estes compostos oferecem muitas vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como: (a) aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis pela sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade; (b) maior seletividade (CHEN *et al.*, 2008b); (c) são tolerantes a condições de temperatura, pH e força iônica; (d) podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (BENINCASA *et al.*, 2002) (e) podem ser mais eficientes que os surfactantes químicos, além da possibilidade de sua produção por meio de fermentação, e seu potencial aplicações (BANAT, 1995; MEIRA, 2007; ISA *et al.*, 2007).

Tabela 3.3. Principais classes de biosurfactantes e micro-organismos envolvidos

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

Fonte: Banat (2010) e Nitschke e Pastore (2002)

Estas características favoráveis podem ser uma alternativa para o uso destes compostos em substituição aos surfactantes sintetizados quimicamente, pois, exibem propriedades semelhantes tal como detergência, emulsificação, formação de espuma e molhabilidade, em uma variedade de aplicações (YEH *et al.*, 2006; BANAT *et al.*, 2000). Segundo Barros *et al.* (2007) entre 70 a 75% dos surfactantes utilizados em países desenvolvidos são de origem petroquímica, o qual motiva a substituição destes, devido à necessidade da diminuição de produtos não biodegradáveis e menos agressivos ao ambiente.

Os biosurfactantes apresentam uma gama de aplicações direcionadas para os mais diversos ramos industriais, destacando-se as indústrias de cosméticos, alimentícia, química, agrícola e de produtos de limpeza (YEH *et al.*, 2006). Suas propriedades únicas também oferecem potencial de exploração em aplicações na indústria petrolífera

(BANAT *et al.*, 2010; DESAI e BANAT, 1997). Por apresentarem efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (CUBBITO *et al.*, 2004), no tratamento de resíduos de petróleo (MULLIGAN, 2009), na recuperação de petróleo (SEN, 2008), a indústria petrolífera é o grande mercado para os biosurfactantes desde à década de 1990.

Ghojavand *et al.* (2008) relatam que tais compostos são amplamente utilizados nas indústrias de emulsificantes, como um ingrediente funcional nas indústrias de alimentos, microbiológicas, farmacêutica e agente terapêuticos nas indústrias biológicas, como um agente de controle biológico em aplicações agrícolas, no processamento *downstream* para aplicações em bioprocessamento e na saúde, além dos produtos de beleza para as indústrias de cosméticos. Detalhes abrangentes de várias aplicações potenciais de biosurfactantes com especialidades químicas são mostrada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes.

Funções	Campo de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistema de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Mistura carvão/água, calcário/água
Fungicida	Controle biológico de fitopatogênicos

Fonte: Banat *et al.*, (2000)

Muthusamy *et al.* (2008) discutiram os papéis e aplicações de biossurfactantes, principalmente com foco em áreas como alimentos e indústrias relacionadas (como emulsificantes, espumantes, solubilizantes e agentes antiadesivo), biomedicina e terapêutica (como agentes antimicrobianos, imunoreguladores e imunomoduladores e seu possível papel na atividade citotóxica). Com estas aplicações especializadas e de baixo custo na área da biomedicina, podemos ver os biossurfactantes como as moléculas do futuro.

Apesar de suas inúmeras vantagens, há um problema relacionado com a produção em larga escala. Os altos custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação, ainda continuam sendo os maiores obstáculos para suas aplicações comerciais (YEH *et al.*, 2006). Segundo Chen *et al.* (2008b) o tratamento *downstream* em muitas aplicações biotecnológicas é responsável por até 60% do custo de produção total. Isto levou aos esforços concentrados durante a última década, com foco a minimização dos custos de produção a fim de facilitar o maior uso comercial (MAKKAR *et al.*, 2011).

3.2.1 Surfactina

Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949 quando foram detectadas propriedades antibióticas e hemolíticas de um ramnolípídeo (JARVIS *et al.*, 1949). Posteriormente foi descoberta a existência de um novo composto biologicamente ativo, produzido por *Bacillus subtilis*, que inibia a formação de coágulos de fibrina (ARIMA *et al.*, 1968). Esse composto, por apresentar elevada atividade superficial foi denominado surfactina.

Apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina nos anos 60, foi somente na década de 80 que este biossurfactante lipopeptídico despertou o interesse de pesquisadores como alternativa atraente para substituição dos surfactantes sintéticos (MAIER *et al.*, 2003; PEYPOUX *et al.*, 1999). No entanto, as pesquisas com surfactina e demais biossurfactantes foram intensificadas, devido as suas diversidades químicas, o que leva ao surgimento de uma ampla variedade de compostos com propriedades específicas, possibilitando aplicações nos mais diversos ramos industriais (NITSCHKE e COSTA, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2006; LANG, 2002).

Dentre a classificação dos biossurfactantes, os lipoprotéicos são talvez os mais conhecidos, como a surfactina, iturim e fengicina. A surfactina, sendo considerado

um dos mais poderosos e mais ativos em termos de concentração micelar crítica (CMC) e tensão superficial mínima, que já foram estudados, é o principal biosurfactante sintetizado por várias cepas do gênero *Bacillus* (COOPER *et al.*, 1981; DAVIS *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2008b).

Essa molécula é considerada como um CLPBS (*Cyclic Lipopeptide Biosurfactants*), e sua estrutura geral é um heptapéptido (L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-leu) ligado a um ácido graxo hidróxi que compreende principalmente 14 ou 15 átomos de carbono, e tem um peso molar de 1,036 g/mol (Figura 3.4). O principal ácido graxo conjugado presente é o ácido 3 hidróxi-13-metil-tetradecanóico ligado por uma lactona. A surfactina tem excepcional poder tensoativo, pois tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m (KOWALL *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2008a) em concentrações menores de 20 µM, além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m (COOPER *et al.*, 1981). Esse poder em relação a redução da tensão superficial e a ser mais ativo em CMC baixa pode esta relacionado a dimensão da sua cabeça polar.

A surfactina natural é uma mistura de isoformas que pouco difere em suas propriedades físico-químicas devido às variações no comprimento da cadeia e ramificações de seu componente ácido graxo hidróxi, bem como das substituições dos componentes de aminoácidos do anel peptídeo. Essas variações dependem da linhagem e das condições nutricionais, mais do que de determinação genética. Dessa forma, a atividade biológica da surfactina depende tanto da composição de aminoácidos e da sequência de seu anel peptídeo, como da natureza da fração lipídica (KOWALL *et al.*, 1998, DAVIS *et al.*, 1999). Kowall *et al.* (1998) estudaram a influência das diferentes isoformas de surfactina para aplicações potenciais na áreas biotecnologia e farmacêutica.

Quando comparada a outros biosurfactantes e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) (CMC = 2420 mg/L) e brometo de trimetil amônio (BTA)(CMC = 258,75 mg/L), possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta menores valores de concentração micelar crítica (CMC ≈ 10 mg/L) (CHTIOUI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 1997). Dessa forma pode ser considerado um surfactante biológico de elevada eficiência, pois quanto menor o valor do CMC, maior a eficiência do biosurfactante, exercendo, portanto, o mesmo efeito com pequenas concentrações (MULLIGAN, 2005; SALATI *et al.*, 2011).

Além da atividade de superfície elevada, os preparados de surfactina possuem outras propriedades interessantes, incluindo as propriedades hemolítica, antiviral, antibacteriana e antitumoral. (DAVIS *et al.*, 2001; ISA *et al.*, 2007).

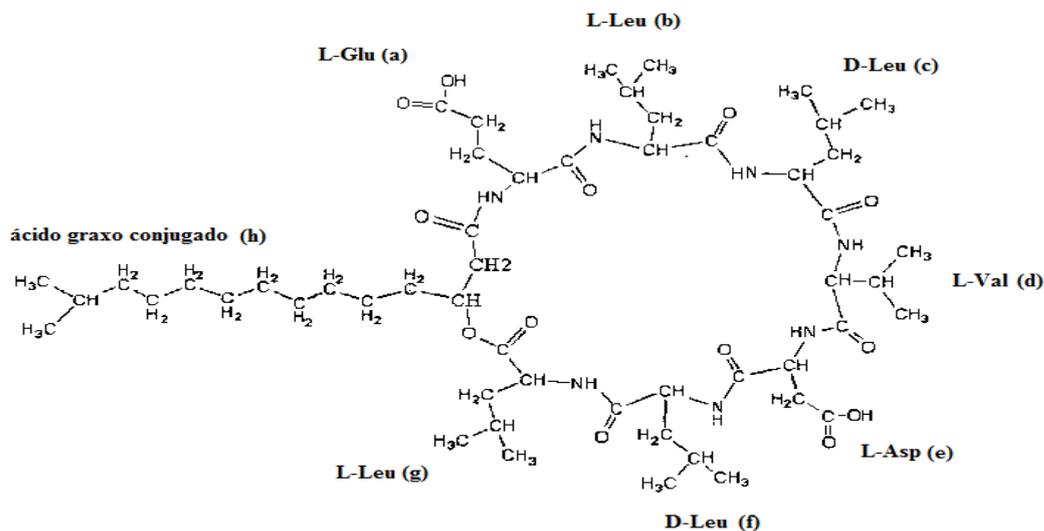


Figura 3.4. Estrutura da principal isoforma da surfactina. Os aminoácidos (a), (d) e (e) correspondem ao ácido glutâmico, valina e ácido aspártico, respectivamente; (b), (c), (f) e (g) correspondem ao aminoácido leucina; (h) corresponde ao ácido graxo 3-hidróxi-13 metil-tetradecanóico. Fonte : Kowall (1998).

Uma diversidade de experimentos demonstrou que a molécula de surfactina é muito estável quando submetida a diversas condições, tolerando mudanças bruscas de temperatura, pH e força iônica do meio, além de possuírem boa solubilidade em alguns compostos (NITSCHKE e PASTORE, 2002, DARVISHI *et al.*, 2011; JOSHI *et al.*, 2008,). Kim *et al.* (1997), avaliaram a resistência em condições extremas de temperatura, pH e concentrações salinas de biosurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus sp* C9, e observaram uma alta estabilidade e manutenção das propriedades emulsificantes em temperaturas de 20 a 100 °C por 1 hora, pH de 5,0 a 9,5 e concentrações salinas de 1.000mM de NaCl e 10mM de CaCl₂. Barros *et al* (2008), utilizando outra linhagem, produziram surfactantes com estabilidade a variações de temperatura (100 °C por 140 min ,121 °C por 60 min), pH de 6 a 10 e concentração salina de (2,5 a 20 % de NaCl). Também há relatos de surfactina produzida por outras linhagens de *Bacillus sp* comprovando sua estabilidade a variações de temperatura (100 °C por 2 h, 121 °C por 0,5 h e 135 °C por 1 h), de pH 6 a 12, em concentração salina (15 % NaCl) e em presença de enzimas proteolíticas (bromelina, ficina, papaína e

tripsina) (BARROS *et al.*, 2007). Entretanto, essa característica de funcionalidade da surfactina sob condições severas não pode ser observada no grupo dos surfactantes químicos, demonstrando a estabilidade desse composto natural e que sua utilização pode ser ampla (DARVISHI *et al.*, 2011).

Segundo Davis (2001) surfactina é reconhecido como um dos biosurfactantes mais eficientes disponíveis, mas o alto custo e baixo rendimento envolvidos na produção da mesma são fatores limitantes. Assim, o desenvolvimento de estratégias para a produção de alto rendimento e baixo custo de surfactina é de demanda urgente. Embora alguns estudos tenham sido realizados com o objetivo de otimizar a produção surfactina pela alteração de variáveis importantes, tais como composição do meio, velocidade de agitação e taxa de aeração (CHEN *et al.*, 2006), poucos estudos têm procurado identificar os processos subjacentes que afetam as condições de funcionamento ideal, além de processos de recuperação acessíveis.

3.2.1.1 Aplicações potenciais

Dentre os diversos empregos de surfactina, os mais citados são no campo ambiental, na biorremediação e na lavagem avançada de solos, em aplicações industriais, principalmente na indústria de petróleo para a recuperação avançada de petróleo. E recentemente, em aplicações biomédicas, como agentes de atividade antimicrobiana, anti-adesivos, entre outras funções como anti-inflamatória, antibiótica, antitumoral (BANAT *et al.*, 2010).

Sob o ponto de vista ambiental, diversos relatos na literatura mencionam a aplicação de surfactina na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos (BONGOLO, 1999; MAKKAR, 2003) bem como a sua ação potencial na degradação do pesticida endosulfan e a sua capacidade em remover óleo de areias contaminadas (MÓRAN *et al.*, 2000; MULLIGAN, 2005; SINGH *et al.*, 2007). Foram também relatados estudos do uso desse biosurfactante para a bioremediação em áreas contaminadas com metais pesados. Mulligan (2005) avaliou a ação de surfactina na remoção de metais em solos altamente contaminados. Quando utilizou em seus estudos somente água como agente de remoção, quantidades mínimas de cobre e zinco foram removidas (menos que 1%). Já quando foram utilizados lavagens do solo com 0,25% de surfactina (1% de NaOH), removeu 70% do cobre e 22% do zinco, revelando, portanto, a ação potencial de surfactina neste tipo de processo. Outros estudos relatam que o

emprego de concentrações pequenas de surfactina (40mg/L) foi capaz de melhorar a biodegradação de diesel mais que duas vezes quando comparados sem adição desse composto (MULLIGAN, 2009).

Há aplicações na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas, os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas, podem também ser usada na indústria de mineração, no auxílio ao processo de flotação e separação de calcita e eschelita. E por fim, em produtos de higiene e cosméticos devido a sua compatibilidade com a pele (NITSCHK e PASTORE, 2002).

Dentre todas essas aplicações, a surfactina é empregada em atividades terapêuticas, revelando assim suas propriedades biológicas e caracterizando-a como uma molécula biologicamente ativa (BANAT *et al.*, 2000; SINGH e CAMEOTRA, 2004).

A atuação da surfactina como agente antimicrobiano esta relacionada ao fato de que esse composto inibe a ação de micro-organismos patógenos de alta resistência, ou seja, tem capacidade de inibir a formação de biofilmes em superfícies sólidas e em sítios de infecção, o que levaria a resistência a antibióticos convencionais (SINGH e CAMEOTRA, 2004; SEYDLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008). Recentemente há relatos que a produção de lipopéptideos antimicrobianos por produtos de *Bacillus* probióticos é um dos principais mecanismos pelos quais eles inibem o crescimento de microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal (BANAT *et al.*, 2010).

A surfactina também age como um anticarcinogênico, no qual a explicação base para essa capacidade é romper membranas que levam à lise celular através do aumento da permeabilidade da membrana, causando perdas metabólicas (BANAT *et al.*, 2010). Verificou-se que esse biosurfactante apresentou atividade antitumoral contra células com carcinoma de Ehrlich e atividade antiproliferativa em experimentos com células dos cânceres de ovário, renal, de próstata, de cólon, de pulmão, de mama e melanomas (SADLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008). Além disso, há fortes evidências de que as propriedades de barreiras da membrana podem ser danificadas em áreas onde os oligômeros da surfactina interagem com fosfolipídeos. Isso causa flutuações estruturais que podem ser o princípio de ação dos antibióticos e de outros efeitos biológicos importantes desse lipopeptídeo (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004).

A ação desta, como agentes antivirais, é demonstrada em diversos estudos. Há relatos da surfactina atuando contra alguns vírus como o herpes simplex, vírus da

imunodeficiência símica, calicivirus felino e o encefalomielite murina (SADLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008). A sua ação como inativadores de vírus está relacionada com o tamanho da cadeia de ácido graxo da molécula, ou seja, com o aumento da hidrofobicidade da cadeia, aumenta a capacidade de inativação do vírus. Isso ocorre devido à incorporação de surfactina na bicamada lipídica induzindo uma desintegração completa do envelope que contém as proteínas do vírus envolvidos na adsorção e penetração, causando a perda de infectividade viral (SADLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008; VOLLENBROICH *et al.*, 1997; KRACHT *et al.*, 1999) .

Relatos na literatura demonstram que surfactina também tem propriedades antimicoplasma e tem sido utilizada em um método rápido e simples para a inativação completa e permanente de micoplasmas (SINGH e CAMEOTRA, 2004). É mencionado que o tratamento com surfactina melhorou as taxa de proliferação e mudanças na morfologia de células mamárias que tinham sido contaminadas por micoplasmas. Além disso, o baixo efeito citotóxico desse composto para as células permitem inativação específica de micoplasmas sem efeitos deletérios significativos sobre o metabolismo celular (VOLLENBROICH *et al.*, 1997; SINGH e CAMEOTRA, 2004).

BANAT *et al.* (2010) relata o papel imunofarmacológico de surfactina em doenças auto-imunes e transplantes. Este trabalho indicou que surfactina tem potentes capacidades imunossupressoras que sugerem importantes implicações terapêuticas para o transplante e doenças autoimunes, incluindo alergia, artrite e diabetes.

Integrando todas essas aplicações, pode-se dizer que a surfactina é mais conhecida por suas interações multifacetadas com sistemas biológicos que resultam em uma série de atividades fisiológicas e bioquímicas. Estas características fazem da surfactina um medicamento potencial para resolver uma série de questões globais de saúde pública e ambiental (SADLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008).

3.4 Métodos de Separação

Os fatores eficiência e economia, em bioprocessos, são à base de toda indústria de biotecnologia com fins lucrativos, dessa forma, estes são a primeira etapa para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos incluindo, os biosurfactantes. O aumento do rendimento desses compostos exigem a combinação de fatores como, componentes do meio de cultura, condições otimizadas de cultura, que irá induzir a máxima e ótima produtividade. Da mesma forma, eficientes técnicas e métodos de

processamento *downstream* são necessários para a recuperação máxima do produto, ou seja, mesmo se a produção ótima for obtida utilizando meios ideais e condições de cultura, o processo de produção é ainda incompleto sem um meio eficiente e econômico para a recuperação dos produtos (MUTHUSAMY *et al.*, 2008). Além disso, há relatos que a recuperação também depende da carga iônica, solubilidade em água, e localização do biosurfactante produzido (intracelular, extracelular ou ligado a célula) (DESAI e BANAT, 1997).

Tratamento *downstream* é, em processos biotecnológicos, o maior responsável pelo aumento do custo de produção total, isso pode ser atribuído a dificuldade de recuperação dos produtos de fermentações, incluindo os surfactantes naturais, que são geralmente excretados em soluções diluídas. Dessa forma, o maior obstáculo para a comercialização da surfactina é a sua recuperação e purificação de caldos de fermentação complexos (SARACHAT *et al.*, 2010; ISA *et al.*, 2007). Os processos finais, na produção de biosurfactante, envolvem a recuperação, concentração, e purificação. A abordagem adequada para esses processamentos dependem do tipo e da natureza dos substratos, da técnica de fermentação e do tipo e das propriedades físico-químicas dos biosurfactantes excretados (SEN e SWAMINATHAN, 2005).

Muthusamy *et al.* (2008) reportam vários métodos convencionais para a recuperação de biosurfactantes, tais como precipitação ácida, extração com solvente, cristalização, e centrifugação. Foi relatado que uma das abordagens mais utilizadas para a recuperação e purificação de surfactina envolve precipitação em pH extremos seguida de extração com solventes orgânicos, cromatografia de adsorção, ou cromatografia em camada delgada (ISA *et al.*, 2007). No entanto, há inconvenientes na utilização desses métodos convencionais, pois além de serem demorados, os solventes orgânicos geralmente utilizados, tais como, acetona, metanol e clorofórmio são dispendiosos, tóxicos a saúde e prejudiciais ao ambiente (MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

Assim, se faz necessário o aprimoramento de técnicas econômicas e ecológicas para a recuperação e concentração desses surfactantes naturais. Sendo assim, há relatos que fracionamento com espuma, uma das técnicas de separação por adsorção em bolha, tem sido utilizado para o processamento *downstream* de biosurfactante com enorme sucesso (SARACHAT *et al.*, 2010).

3.5 Fenômenos de adsorção de tensoativos na interface gás-líquido

Por serem anfipáticas, as moléculas de surfactantes apresentam diferença de solubilidade de suas porções polares e apolares, dessa forma tendem a se acumular na interface gás-líquido. Essa adsorção do tensoativo é acompanhada pela redução gradual da tensão superficial (ADAMSON, 1990).

3.5.1 Lei de adsorção de Gibbs

Em relação aos processos de adsorção, existem dois aspectos que devem ser abordados: o efeito das espécies adsorvidas na energia interfacial final de equilíbrio, e a cinética do processo de adsorção (MYERS, 1988). Nas condições de equilíbrio estabelecido entre as moléculas de tensoativo na interface e aquelas remanescentes no seio da solução, o fenômeno de adsorção na interface gás-líquido, a nível termodinâmico, de soluções diluídas pode ser descrita quantitativamente pela equação de Gibbs (Equação 3.1) (LUCENA, 1995; FLORENCE e ATWOOD, 2003).

$$\Gamma = - \left(\frac{1}{RT} \right) \left(\frac{d\gamma}{d \ln C_b} \right) \quad (3.1)$$

Sabendo que, Γ é a concentração superficial em excesso do soluto, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, γ é a tensão superficial e C é a concentração do soluto no interior da solução. A equação de Gibbs é a forma usual para determinar a isoterma de adsorção de moléculas tensoativas, podendo ser facilmente obtida a partir de dados de tensão superficial (γ) e de concentração de tensoativos no seio do líquido (TADROS, 2005).

A região entre duas fases é geralmente referido como “interface” e representa a região de transição em que características físicas e químicas e sofrem variação (FLORENCE e ATWOOD, 2003). A equação de Gibbs, por meio da relação entre as mudanças na energia interfacial de um sistema, o grau de adsorção de uma espécie na interface e composições de soluto na fase, constitui a base para entendimento termodinâmico do processo de adsorção (MYERS, 1988).

É importante destacar que a equação de Gibbs para a adsorção interfacial serve para faixas de concentrações limitadas, para as quais ocorre apenas a formação de monocamadas. Observando-se o comportamento da tensão superficial com o $\ln C$ (Figura 3.5a) nota-se que a partir de um determinado valor de C praticamente não há

alteração nos valores da tensão superficial, pois há uma saturação da monocamada molecular e desse modo a concentração superficial torna-se desprezível (TADROS, 2005). Para concentrações inferiores é possível ainda observar que em uma ampla faixa de concentrações, a concentração superficial permanece praticamente constante (Figura 3.5b). O comportamento de Γ com C é, portanto, válido até a saturação da monocamada (LUCENA, 1995).

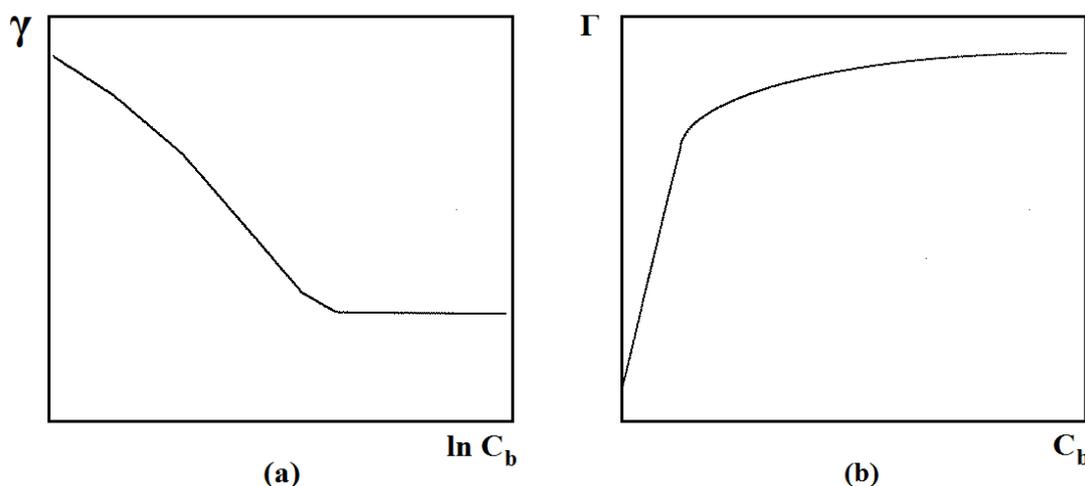


Figura 3.5. (a) Comportamento típico da tensão superficial com a concentração para soluções de moléculas com atividade superficial. (b) Comportamento de Γ com C (isoterma de adsorção).
Fonte: LUCENA (1995)

3.5.2 Isotermas de adsorção de Langmuir

O modelo da isoterma proposto por Langmuir foi desenvolvido baseando-se nas premissas de que a adsorção é limitada a uma monocamada, a superfície do adsorvente caracteriza-se por ser homogênea, as moléculas adsorvidas não interagem entre si e, no caso da ocorrência de adsorção competitiva de compostos diversos, a entalpia de adsorção é a mesma para todas as moléculas.

A curva de concentração superficial e concentração de tensoativos no seio do líquido podem apresentar diversas formas, dependendo do sistema em questão. Porém, a isoterma de adsorção de Langmuir destaca-se por ser o tipo mais comum encontrado para tensoativos que formam apenas uma camada de adsorção (ROSA, 1996). A equação que descreve o modelo para a isoterma de adsorção de Langmuir é dada pela equação 3.2:

$$\Gamma$$

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{m\acute{a}x} \cdot C_b}{K_d + C_b} \quad (3.2)$$

onde C_b é a concentração de tensoativo na fase líquida, K_d é a constante de dissociação ou de equilíbrio, Γ e $\Gamma_{m\acute{a}x}$ representam a concentração e concentração máxima de tensoativo adsorvido na interface gás-líquido, expresso em mols por unidade de área, respectivamente.

3.5.3 Processo de separação em coluna com espuma

O fracionamento com espuma é uma técnica de separação que recupera soluções com surfactantes via adsorção em bolhas de ar, promovendo o enriquecimento de soluções de espécies de superfície ativa (WINTERBURN *et al.*, 2010).

No método de separação com espuma, compostos de superfície ativa alta adsorvem preferencialmente nas bolhas de ar por conta das suas característica anfifílica. Como esses compostos tendem a reduzir a tensão gás/líquido, há uma estabilidade, provocada pela aderência do soluto no filme, de modo que as bolhas sobem à superfície do líquido para formar espuma (Figura 3.6). Dessa forma, as moléculas menos tensoativas permanecem retidas no meio líquido (QU *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2010).

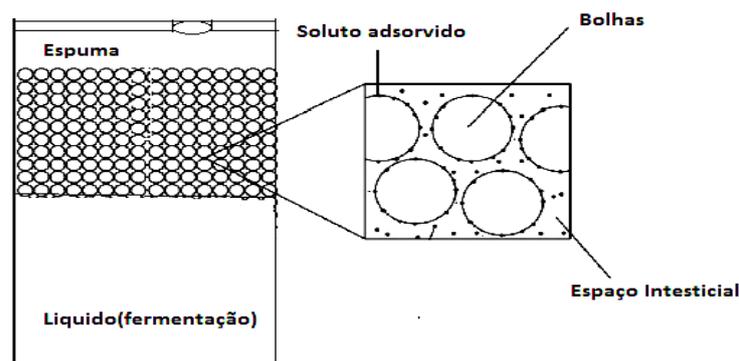


Figura 3.6. Fenômeno que ocorre durante o fracionamento com espumas. Fonte: Qu *et al.* (2008).

A ascensão da espuma é formada por injeção de gás através de um seio de líquido. A fase de espuma pode ser recolhida pelo colapso das bolhas de gás e sua fração líquida resultante dessa quebra reduz ao longo do tempo, significando que o

surfactante adsorvido é recuperado em um volume reduzido, sendo obtidos, então, um líquido enriquecido conhecido como foamate (WINTERBURN *et al.*, 2011). A concentração do soluto (biosurfactante) no novo líquido ou produto de topo é geralmente várias vezes a concentração da solução líquida inicial (QU *et al.*, 2008).

As principais características da técnica de fracionamento incluem o baixo custo, alta eficácia, menor espaço requerido, operação rápida e boas possibilidades de ambos, concentração contínua de produtos e recuperação *in situ* (SARACHAT *et al.*, 2010). O uso dessa técnica para a recuperação de biosurfactante a partir de caldo de cultura tem o potencial de reduzir o custo desse processo, que atualmente contribui com elevado valor econômico no total de produção, podendo ser aplicado como uma unidade de operação *downstream* ou como um processo integrado para a recuperação *in situ* (WINTERBURN *et al.*, 2011). Chen *et al.*, (2006), Davis *et al.* (2001) e Sarachat *et al.* (2010) comprovaram em seus estudos que o fracionamento com espuma em batelada pode proporcionar tanto uma alta eficiência de recuperação quanto uma razão de enriquecimento elevado. Quando a coluna de fracionamento de espuma está integrada ao estágio de produção, biosurfactante pode ser eficientemente recuperado do recipiente de cultivo (CHEN *et al.*, 2006).

Davis *et al.* (2001) estudaram a recuperação de surfactina produzida pelo cultivo de um tipo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando-se colunas de fracionamento com espuma. Este trabalho foi realizado em uma primeira etapa por meio de uma simples coluna de fracionamento com bolhas e espuma, e para efeito de comparação em um biorreator de baixo volume acoplada a uma coluna de vidro de pequena dimensão para o fracionamento com espuma utilizando-se somente de condições aleatórias da velocidade de agitação (Figura 3.7). No entanto, não há estudos na literatura que relatem o emprego das variáveis combinadas (agitação e aeração) para o processo de produção e concentração simultânea de surfactina.

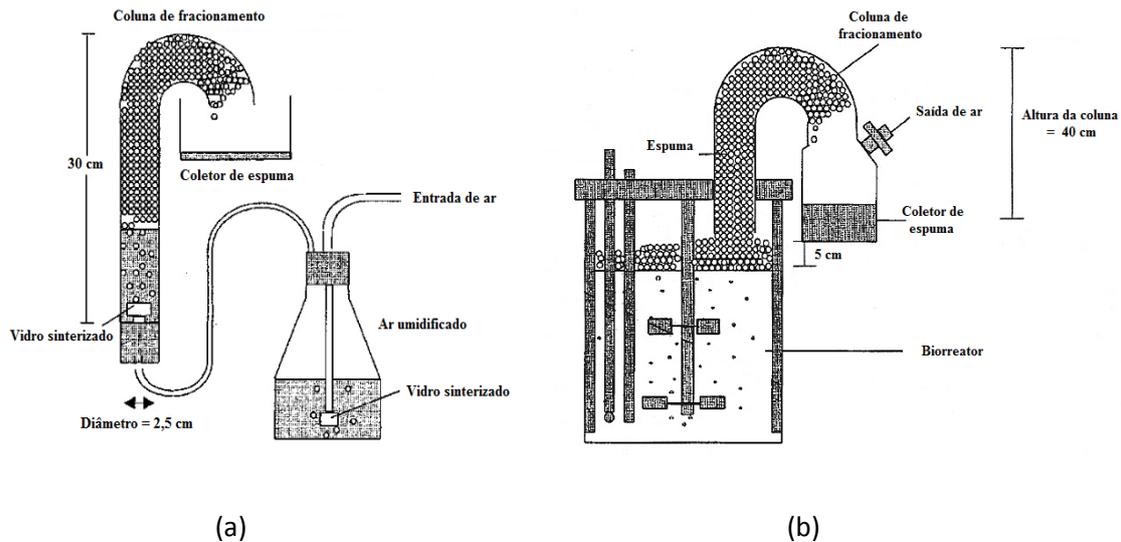


Figura 3.7. Estudo da recuperação e concentração de surfactina. (a) Aparato experimental utilizado nos estudos de fracionamento de surfactina com espuma; (b) Aparato experimental (sistema integrado) utilizado durante os estudos de produção e recuperação simultânea de surfactina. DAVIS *et al.* (2001)

Winterburn *et al.* (2011) relataram que fracionamento com espuma pode também ser aplicado para aumentar a produtividade das fermentações por meio da redução da degradação do produto e que o seu desempenho pode ser avaliado utilizando dois parâmetros: o enriquecimento e recuperação de surfactante.

3.6 Formação e leito de espuma

Espumas são sistemas coloidais, termodinamicamente instáveis, que consiste na dispersão de um gás num meio líquido, no qual a maior parte do volume total é ocupado pelo gás. Isso é representando em uma estrutura tridimensional constituída de células gasosas envolvidas por um filme líquido contínuo (Figura 3.8) (LUCENA, 1995; FIGUEREDO *et al.*, 1999). As espumas podem ser formadas por dois métodos, quando um gás contido em um sistema à parte é disperso na fase líquida, por agitação mecânica ou borbulhamento através de orifícios finos (MYERS, 1988), ou quando os gases dissolvidos na solução são liberados pela redução de pressão do sistema ou aumento da temperatura (LUCENA, 1995).

As espumas apresentam uma estrutura definida em decorrência do conjunto de forças envolvidas na sua formação e estabilização. É proposta uma classificação das espumas de acordo com sua geometria: espuma esférica, que consiste de bolhas

esféricas separadas pela fase contínua, sendo a fase dispersa um gás. São observadas frequentemente no estágio inicial da formação da espuma; e espuma poliédrica, que consiste de bolhas muito próximas que apresentam faces poliédricas com filmes lamelares separando as porções da fase dispersa (DALTIM, 2011).



Figura 3.8. Representação estrutural das bolhas de espuma. Fonte: DALTIM (2011)

Durante a formação de espuma, as bolhas esféricas se aproximam uma das outras expulsando parte do líquido entre elas, diminuindo a distância entre as bolhas de gás, as quais mudam a conformação formando filmes (MYERS, 1988). Essa redução da distância entre as bolhas é observada devido à drenagem do líquido e conseqüentemente afinamento dos filmes (DALTIM, 2011; FIGUEREDO *et al.*, 1999). Há estudos que relatam que as bolhas com geometria esférica existem somente na região próxima à interface das colunas de líquido e de espuma. Em razão disso, as bolhas de gás podem ser consideradas poliédricas em toda a extensão da coluna de espuma (ROSA, 1996).

Apenas uma pequena fração de líquido, conhecido com lamela, é transportada na superfície do filme (bolha) para a fase de espuma devido à drenagem por gravidade (QU *et al.*, 2008). Heyd (2008) relatou que com aumento do tempo de residência da espuma em coluna de fracionamento com espuma, forças gravitacionais resultam na drenagem do líquido nas lamelas de espuma, enriquecendo um tipo de biosurfactante (rhamnolipídeo).

Na junção entre os filmes, região de conexão entre duas bolhas adjacentes são formadas colunas de líquido chamados *bordas* ou *canais de Plateau*, que tem semelhança a um triângulo de faces curvas como mostrado na Figura 3.9. Estes canais

estão interconectados, estruturando a rede que constitui a fase líquida da espuma (FIGUEREDO *et al.*, 1999; LUCENA, 1995).

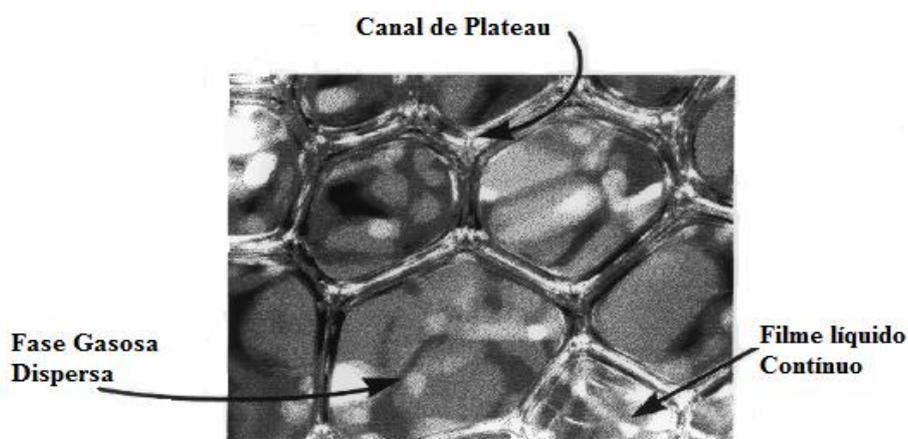


Figura 3.9. Estrutura de uma espuma constituída por uma fase gasosa e uma fase líquida (filmes e canais de Plateau). Fonte: FIGUEREDO *et al.* (1999).

Lucena (1995) relata que um importante fenômeno responsável pelo maior enriquecimento do produto de topo diz respeito à drenagem de líquido, que ocorre no leito de espuma devido à ação gravitacional e pela sucção provocada pelos canais de Plateau. Os canais de Plateau, devido à presença de curvatura, favorecem grande diferença de pressão entre as fases líquida e gasosa, gerando grande importância para a drenagem em espumas. O líquido é direcionado da região lamelar à região de menor pressão local (os canais) (MYERS, 1988). Com o escoamento do líquido, os filmes afinam até atingir uma espessura crítica a partir da qual as interações de van der Waals e as propriedades elétricas da superfície, dentre outros fatores, passam a governar o processo de afinamento dos mesmos (Figura 3.10).

Quando os compostos de superfície ativa estão presentes, sua adsorção na interface gás-líquido serve para retardar a perda de líquido das lamelas, e em alguns casos, para produzir maior estabilidade mecânica no sistema. À medida que ocorre a drenagem do líquido, as moléculas tensoativas, adsorvidas na interface são arrastadas com o fluxo, produzindo irregularidades na sua concentração ao longo da interface, provocando gradientes locais de tensão superficial. O efeito que descreve a difusão de compostos na película do filme no sentido oposto ao fluxo de drenagem visando o restabelecimento da tensão superficial é conhecido como *Efeito de Gibbs-Marangoni*. Esse fenômeno rege o princípio da preservação das interfaces, no qual a estabilidade é

alcançada devido ao efeito combinado da *elasticidade de Gibbs*, que considera uma tensão superficial de equilíbrio e da *elasticidade de Marangoni*, efeito este mais superficial associado às variações instantâneas de tensão superficial (FIGUEREDO *et al.*, 1999; WEISSENBORN e PUGH, 1995)

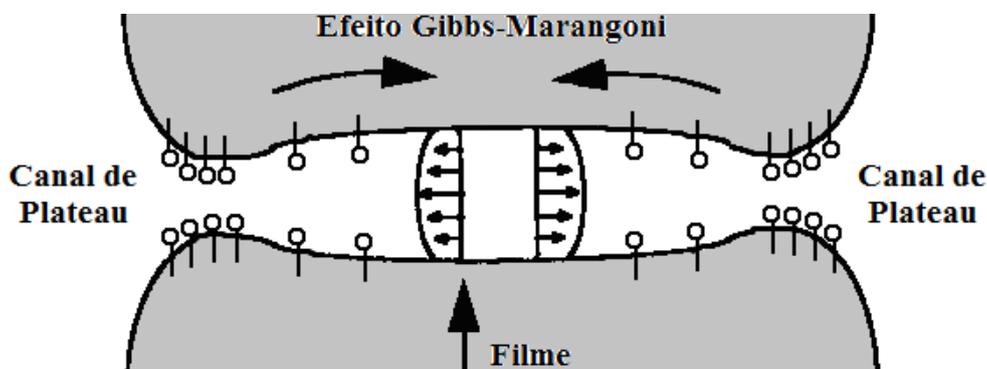


Figura 3.10. Representação esquemática da drenagem do filme para os canais de Plateau (EFEITO GIBBS-MARANGONI) Fonte: Adaptado de MYERS (1988)

Figueredo *et al.* (1999) observa que durante a formação de espuma, três processos podem ocorrer simultaneamente: rearranjo das células gasosas, devido à difusão de gás entre as bolhas, drenagem do líquido intralamelar pelos filmes e canais de Plateau, gerando assim o afinamento dos mesmos e, por fim, a ruptura da célula.

Em processos biotecnológicos, a formação de espumas muitas vezes representa um problema. A espuma pode induzir a morte celular e limitar o desempenho de etapas do processamento *downstream*. Por outro lado, as diferenças da capacidade de formar espumas de compostos podem ser usadas para a separação de substâncias como os tensoativos (MERZ *et al.*, 2011)

O controle da formação de espuma em fermentações é essencial para a produção e o processo em grande escala. A suscetibilidade da problemática formação de espuma é alta em sistemas, onde os produtos biosurfactante extracelular estão presentes, devido à sua atividade de superfície (WINTERBURN *et al.*, 2011). As espumas são criadas pela agitação e aeração do sistema com finalidade de fornecer quantidades de oxigênio suficiente para as fermentações aeróbicas e são estabilizadas por esses compostos (DAVIS *et al.*, 2001).

Por outro lado, estratégias possíveis incluem a utilização de formação de espuma como uma peça chave para processos de concentração e recuperação e tem sido

objeto de crescente atenção nos últimos anos (WINTERBURN *et al.*, 2011, CHEN *et al.*, 2006; DAVIS *et al.*, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Surfactina utilizada

Foi utilizada nesse trabalho uma surfactina padrão de *Bacillus subtilis*, de lote 090M4036, massa molar 1036 g/mol com pureza de 98% adquirida da Sigma-Aldrich, utilizada para a obtenção da curva analítica.

4.2 Curva Analítica de Surfactina

Uma suspensão de surfactina com 98% de pureza foi preparada em uma concentração de 20mg/L, pesando-se aproximadamente 4,0 mg do padrão do biosurfactante em uma balança analítica (Mettler Toledo/AL204) e adicionando 200mL de água ultra pura. A suspensão homogeneizada utilizando um agitador magnético durante 24 h e mantida a temperatura de 45°C em banho termostatizado. Em intervalos de 12 h nessa condição, a suspensão foi colocada em sonicador (Unique-USC 2850A) por 35 minutos, visando aumentar a solubilidade da surfactina em meio aquoso. A partir desta solução, diluições nas concentrações de 2,0 a 20 mg/L foram preparadas e utilizadas para medidas das suas respectivas tensões superficiais, a 25°C, adotando o método de placa de Wilhelmy. E a curva analítica foi obtida a partir da tensão superficial de surfactina (mN/m) e logaritmo neperiano da concentração ($\ln C$), expressa em (mol/cm³) (Anexo 8.1).

4.3 Micro-organismos e Meio de cultura

O micro-organismo empregado nesse trabalho foi uma cepa de *Bacillus sp*, linhagem denominada ITP-001, pertencente ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP). O *Bacillus sp* ITP - 001 foi isolado a partir do solo contaminado por petróleo. O micro-organismo foi preservado em tubos com ágar nutriente inclinado e estocado a 4°C.

O meio de cultura constituiu-se (% p/v) de: amido (2,0), peptona (0,13), extrato de levedura (0,6), MgSO₄.7H₂O (0,05), NaNO₃ (0,3), KH₂PO₄ (0,1). Após a elaboração do meio de cultura o pH do mesmo foi ajustado para 7,0. O meio foi utilizado anteriormente para a elaboração do inóculo. O inóculo foi uma fração de 10% (v/v) do biorreator.

4.4 Produção e concentração integrada de Surfactina

4.4.1 Planejamento experimental

Para a identificação das possíveis variáveis que afetam significativamente o processo integrado de produção e concentração de surfactina foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central. Foram avaliadas no processo a relação das variáveis independentes velocidade de agitação (rpm) e aeração (vvm) na produção de surfactina em processos fermentativos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Variáveis avaliadas com seus respectivos níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 .

Variáveis		Níveis		
Agitação (rpm)	X_1	200	300	400
Aeração (vvm)	X_2	1,0	1,5	2,0

Os ensaios, realizados aleatoriamente no bioreator integrado a coluna de espuma, estão dispostos em ordem na matriz do planejamento (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Matriz do planejamento fatorial 2^2 com replicata no ponto central.

Ensaio	Níveis codificados		Níveis Reais	
	X_1	X_2	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)
1	-1	-1	200	1,0
2	1	-1	400	1,0
3	-1	1	200	2,0
4	1	1	400	2,0
5	0	0	300	1,5
6	0	0	300	1,5
7	0	0	300	1,5

Como variável resposta do planejamento, foram quantificados dados de concentração de surfactina a partir de curva de calibração Anexo 8.1 (C_s – mg/L) obtidos no final da coluna de espuma, para todas as combinações de níveis das variáveis. Os resultados obtidos no delineamento experimental foram utilizados para estimar os efeitos das variáveis (velocidade de agitação e aeração) sobre as respostas e, então, definir estatisticamente, quais e quanto estas variáveis afetam significativamente o processo de concentração do biosurfactante por meio da integração de uma coluna de espuma ao meio de produção.

4.4.2 Aparato experimental

O aparato experimental utilizado nos experimentos consiste de um biorreator de bancada de tanque agitado/aerado com capacidade total 4,5 L. A fim de remover o produto de interesse por meio da fase espuma, uma coluna de vidro com 50 centímetros de altura e 25 milímetros de diâmetro foi acoplada verticalmente em uma das saídas do headplate biorreator. Na parte inferior da coluna há um prolongamento de diâmetro menor, aproximadamente 1,5 centímetros, de forma a se ajustar a saída do biorreator. A base da coluna foi ajustada de maneira que ficasse 5 centímetros acima do nível da cultura líquida. Na parte superior da coluna há uma região de curvatura acentuada de 180 ° que permitiu recolhimento de espuma arrastada pelo ar. Nessa região, está acoplado um recipiente de vidro para a coleta de espuma proveniente da fermentação e ascendida através da coluna (Figura 4.1). As células de espumas rompem-se espontaneamente e o líquido ou produto de topo acumulava-se no recipiente sendo, então, coletado como amostra para análise.

Os experimentos iniciavam-se com a introdução de 3,0 L de meio de cultura, previamente preparado, no biorreator. Após alimentação submeteu-se a esterilização por 15 min, a 121°C em uma autoclave vertical (Phoenix - AV50). Em seguida, após resfriamento, imergia-se o eletrodo de oxigênio por um intervalo de tempo de no mínimo 6 horas para o processo de polarização. Quando atingido o tempo desejado fez-se a calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido e pH nas temperatura ambiente. Após as calibrações, elevava-se a temperatura do meio para 37°C, temperatura ótima de crescimento do micro-organismo até atingir o equilíbrio térmico. Quando atingia a temperatura desejada introduzia-se o inóculo pela entrada de

alimentação do biorreator. A temperatura do sistema foi mantida constante por todo experimento.

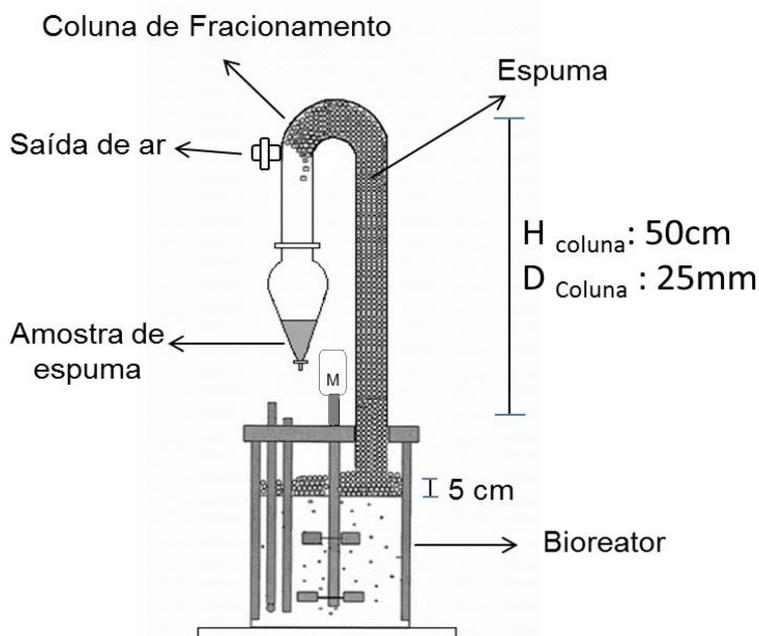


Figura 4.1. Aparato experimental (sistema integrado) utilizado durante os estudos de produção e recuperação simultânea de surfactina. Adaptado de Davis *et al.* (2001).

Acoplava-se uma coluna de vidro em uma das saídas do biorreator e a conectava em um recipiente de coleta de espuma. A agitação e aeração eram ajustadas pelo software e executadas, respectivamente, através de um motor e um compressor pertencente ao biorreator. As fermentações eram operadas nas condições descritas no planejamento de modo a obter as melhores valores de recuperação e o aumento de concentração do sistema.

O biosurfactante concentrado é removido do meio de cultura uma vez que é produzido, sendo recuperado através da ascensão da espuma gerada no meio, a coluna de fracionamento com espuma. Essa concentração é alcançada através da adsorção do biosurfactante na interface das bolhas de ar e principalmente o processo de drenagem que ocorre ao longo da coluna de espuma (Figura 4.1).

4.5 Métodos analíticos

Análises do substrato na etapa de produção foram feitas com a finalidade de controlar o processo fermentativo. Foram conduzidas retirando-se 18 mL da amostra, centrifugando-as a 3000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do pH, da dosagem de amido, dosagem de proteína, dosagem de glicose e análises de tensão superficial para determinação da concentração de surfactina.

4.5.1 Concentração de Massa Celular Seca

Para a determinação de massa seca foram utilizados os precipitados dispostos nos tubos de ensaios após os 15 minutos de centrifugação. Estes foram secos em estufa a 105°C até peso constante.

4.5.2 Concentração de Amido

A determinação da concentração de amido foi analisada pelo método colorimétrico de SOCCOL (1992). Medidas no espectrofotômetro (Varian / Spectrophotometer 50 Bio) foram feitas com densidade ótica a 620 nm, utilizando amido como padrão.

4.5.3 Concentração de proteína

Determinou-se da concentração de proteína pelo método de BRADFORD (1976) em absorbância a 595 nm. O ensaio foi calibrado usando concentrações conhecidas de Albumina de Soro Bovino (BSA).

4.5.4 Concentração Glicose

A dosagem de glicose foi determinada utilizando um *Kit* de ensaio de glicose (Doles), a 510 nm de acordo com as instruções. O padrão utilizado foi a glicose.

4.5.5 Determinação da concentração de surfactina

Os valores da concentração de surfactina das amostras de espuma coletadas na coluna foram obtidas por meio das medições de tensão superficial a 25 °C usando um

tensiometro (Attension/Sigma 700) pelo método da placa de Wilhelmy. Com medidas de tensão superficial em várias concentrações de surfactina foi construída uma curva analítica da tensão em função de concentração de surfactina (Anexo 8.1).

4.5.6 Recuperação e enriquecimento de surfactina

As condições de operação ótima foi selecionada com base na maior valor de concentração e nos parâmetros calculados a partir das seguintes equações:

$$\text{Recuperação de surfactina (\%)} = \left[\frac{m_{\text{espuma}}}{m_{\text{espuma}} + m_{\text{liquido}}} \right] \times 100$$

$$\text{Enriquecimento de surfactina} = \frac{C_{\text{espuma}}}{C_{\text{liquido}}}$$

Em que m_{espuma} e m_{liquido} refere-se a massa de surfactina na espuma e o recolhido no caldo de fermentação, e C_{espuma} e C_{inicial} corresponde a concentração média na espuma e no meio de fermentação.

4.6 Parâmetros cinéticos

Alguns parâmetros cinéticos, tais como: taxa de crescimento específico (μ em h^{-1}), as taxas específicas de consumos de substrato e formação de produto (q_S e q_P em $\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$) e os fatores de rendimento de biomassa celular seca e produto ($Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ em g/g) foram determinados em condições de produção máxima de surfactina usando as equações de 1-5, onde X , S , e P representa a biomassa, substrato (amido) e o produto (surfactina) respectivamente.

$$\mu = \frac{\Delta X}{X \Delta t} \quad (4.1)$$

$$q_S = \frac{\Delta S}{X \Delta t} \quad (4.2)$$

$$q_P = \frac{\Delta P}{X \Delta t} \quad (4.3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (4.4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (4.5)$$

4.7 Caracterização

4.7.1 Atividade antimicrobiana

Ensaio de atividade antimicrobiana foram determinados a fim de testar a potencialidade da surfactina produzida pelo *Bacillus* sp ITP-001 em relação ao poder de inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Esses ensaios foram analisados com amostras de espuma em diferentes concentrações de surfactina. Cetaconazol (50 µg/mL) e tetraciclina (50 µg/mL) foram empregados como compostos antimicrobianos para fungos e bactérias (controle positivo), respectivamente. O controle negativo foi baseado em uma solução aquosa de NaCl 0,9%. Os micro-organismos alvos, *Escherichia coli* CCT-0355 (*E. coli* CCT-0355), *Staphylococcus aureus* ATCC-6533 (*S. aureus* ATCC-6533), *Fusarium* sp LM03, *Candida albicans* ATCC-76645 (*C. albicans* ATCC-76645), foram escolhidos com base em suas diferentes morfologias.

Esses micro-organismos foram desenvolvidos em meio Bushell–Hass composto por: (g/L) MgSO₄, 0,2; CaCl₂, 0,02; KH₂PO₄, 1,0; (NH₄)₂HPO₄, 1,0; KNO₃, 1,0; e FeCl₃, 0,05 até uma densidade óptica de 1,0 na escala MacFallen. Suspensões (1mL) destes micro-organismos foram uniformemente espalhados em placas com meios Müller–Hinton e Sabouraud para bactérias e fungos, respectivamente. Poços de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram formadas com um tubo de vidro esterilizado por meio de uma bomba de vácuo. A amostra de maior concentração de surfactina obtida (4,5 g/L), livre de células, foi diluídas para quatro concentrações (2,3 g/L; 1,5 g/L, 1,1 g/L, 0,9 g/L) e então foram transferidos (50 µL) para os poços das placas de ágar, previamente inoculado com os micro-organismos alvos. As placas foram incubadas a 37°C e o diâmetro do halo de inibição foi medido após 24h (*E. Coli* CCT-0355 e *S. aureus* ATCC-6533) e 48h (*C. albicans* ATCC-76645 e *Fusarium* sp. LM03). Todas as determinações foram realizadas em triplicate (desvio padrão < 1,5).

4.7.2 Atividade e estabilidade emulsificante

A atividade emulsificante foi medida de acordo com o método de Lima *et al.* (2009). A amostra de espuma coletada foi centrifugada a 3000rpm e a fase aquosa

foi separada e filtrada usando um filtro de membrana de 0,42 μ m. Óleos vegetais (óleo de oliva, coco, milho, soja, girassol e canola), hidrocarbonetos (tolueno, xileno, querosene) e óleo mineral foram utilizados para essa determinação. A emulsão foi preparada pela mistura de 60 μ L de óleo com 3mL da amostra coletada. Essa mistura foi em seguida agitada durante 2 minutos em temperatura ambiente e mantida em repouso por 10 minutos antes de ler a absorbância a 540nm. O branco usado era apenas o caldo livre de células e as medidas foram determinadas em intervalos de 10 minutos. Uma unidade de atividade de emulsificação foi definida como quantidade de biosurfactante que afetou uma emulsão com uma absorbância de 540nm de 1,0.

Os estudos de estabilidade foram determinados por meio da habilidade do biosurfactante a reduzir a taxa de decaimento da emulsão. Supondo uma cinética de primeira ordem foi dada pela equação:

$$\frac{d(EA)}{dt} = -k_d(EA) \quad (4.6)$$

onde EA foi a atividade emulsificante, t foi o tempo (min) e k_d é a constante de decaimento. Integrando a equação 4.6 entre o tempo 0 e t:

$$\ln\left(\frac{EA}{EA_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (4.7)$$

onde EA_0 foi à atividade de emulsificação no tempo inicial (t=0).

A inclinação do gráfico $\ln(EA/EA_0)$ versus t foi a constante de decaimento (k_d), o qual descreveu a habilidade de estabilização. À medida que decresce k_d , maior a estabilidade e a relação pode ser mostrada pela equação 4.8:

$$ES = -\frac{1}{k_d} \quad (4.8)$$

A estabilidade de emulsificante foi quantificada com os diferentes óleos na temperatura de 25°C, utilizando as amostras de espuma coletadas livre de células.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse tópico são demonstrados, analisados e discutidos os resultados obtidos do processo integrado de produção e concentração simultânea.

5.1 O efeito das taxas de agitação e aeração na concentração de surfactina

A fim de avaliar o efeito combinado das taxas de agitação (X_1) e aeração (X_2) sobre a produção e concentração de surfactina em fermentação com culturas de *Bacillus* sp. ITP-001 os experimentos foram realizados utilizando um planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central de acordo com a matriz da Tabela 5.1. Alguns trabalhos publicados discutem o efeito isolado desses parâmetros para aumentar produção e concentração de surfactina com alguns gêneros de *Bacillus* (Najafi *et al.*, 2010; Winterburn *et al.*, 2011). O planejamento estatístico foi realizado para determinar as condições em que a melhor concentração de surfactina foi alcançada na coluna de espuma. Os valores dos níveis reais foram: 200 a 400 rpm e 1,0 a 2,0 vvm, respectivamente, para agitação e aeração.

Tabela 5.1. Efeito das variáveis aeração e agitação na variável resposta (concentração de surfactina).

Ensaio	X_1	X_2	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Concentração máxima (g/L)
1	-1	-1	200	1,0	4,54
2	+1	-1	200	2,0	0,09
3	-1	+1	400	1,0	1,41
4	+1	+1	400	2,0	0,42
5	0	0	300	1,5	1,01
6	0	0	300	1,5	1,15
7	0	0	300	1,5	1,01

X_1 : Valor codificado para agitação

X_2 : Valor codificado para aeração

Pode-se observar que o a maior concentração de surfactina foi obtida com menor taxa de agitação (200 rpm) e aeração (1,0 vvm), alcançando um valor elevado de 4,5 g/L, comparado as outras condições empregadas. Quando a taxa de agitação foi mantida constante (200 rpm) e a aeração foi aumentada (2,0 vvm), foi obtido o menor valor de concentração, apresentando um máximo para toda corrida de 0,09 g/L.

Os ensaios operados no nível mais alto de agitação do planejamento (400rpm) independente dos níveis de aeração empregado apresentaram uma menor eficiência no processo de concentração (1,4 g/L e 0,42 g/L) quando comparado com o valor de concentração de surfactina obtido nos menores níveis para ambos parâmetros (4,5 g/L). Os resultados sugerem que o aumento da aeração e da agitação diminui a concentração de surfactina.

Foi observado que quando o processo de fracionamento com espuma é submetido a altas vazões volumétricas de gás, os valores de concentração surfactina na espuma são relativamente baixas, ao passo que, para baixas vazões volumétricas, os valores de concentração do biosurfactante foram mais expressivos.

Com base nos resultados obtidos, foram gerados o diagrama de Pareto (Figura 5.1), a análise de variância ANOVA (Tabela 5.2) e a superfície de resposta (Figura 5.2).

A análise de variância (ANOVA) para a concentração de surfactina no estudo em sistema integrado está apresentada na Tabela 5.2. Pode-se observar que todas as variáveis foram significativas por meio de um menor *valor p* em um nível de significância de 99 % para variáveis isoladas e a interação entre elas.

Tabela 5.2. Análise de Variância (ANOVA) para a concentração de surfactina por meio da coluna de espuma.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F**	P***
Curvatura	520459	1	520459	89,611	0,010976
(X ₁)Agitação	2005056	1	2005056	345,223	0,002884*
(X ₂)Aeração	7311616	1	7311616	1258,887	0,000793*
X ₁ .X ₂	3048516	1	3048516	524,882	0,001900*
Erro	11616	2	5808		
Total	12897263	6			

R²= 0,99

*Variáveis significativas

**F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade de ajuste.

***p: Teste estatístico para estimativa do intervalo de confiança do modelo.

Por meio do diagrama de Pareto (Figura 5.1), pode-se também verificar que as variáveis isoladamente e combinadas entre si apresentaram um efeito significativo sobre a concentração de surfactina quando a coluna de espuma foi integrada meio de produção.

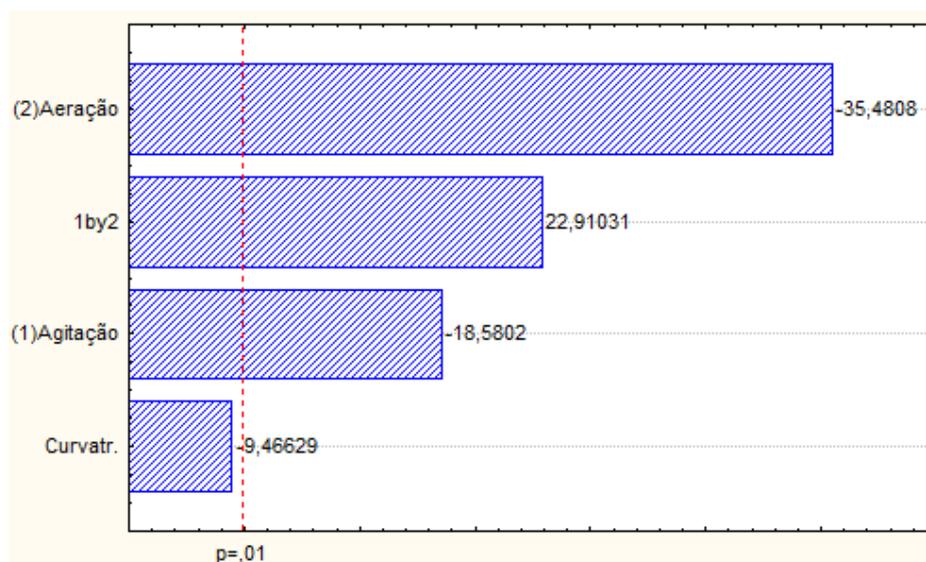


Figura 5.1. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a concentração de surfactina.

Observa-se a partir do diagrama de Pareto que a variável que mais influenciou para o aumento da concentração de surfactina foi à aeração. O sinal negativo exibido na variável significa que quando passa de um nível +1 (2,0 vvm) para um nível -1 (1,0 vvm) aumenta a resposta (concentração de surfactina). Isso também pode ser atribuída a variável agitação. Ou seja, mostram que os menores valores da aeração e da velocidade de agitação são os mais indicados visto que levam aos maiores valores de concentração de surfactina (Figura 5.2).

Apesar da maior produção de espumas serem geradas em níveis mais altos de agitação, verificou-se por meio da superfície de resposta (Figura 5.2) que concentração mais elevada de surfactina é obtida nas taxas de aeração e agitação menores (200 rpm e 1,0 vvm). Isto pode se atribuído ao fato de que as taxas mais baixas de agitação em sistema, salva a perda súbita de líquido, devido à pressão e o fluxo de ar

reduzido, o qual facilita o trabalho de drenagem de líquido na coluna e melhora a adsorção do biosurfactante na interface das bolhas.

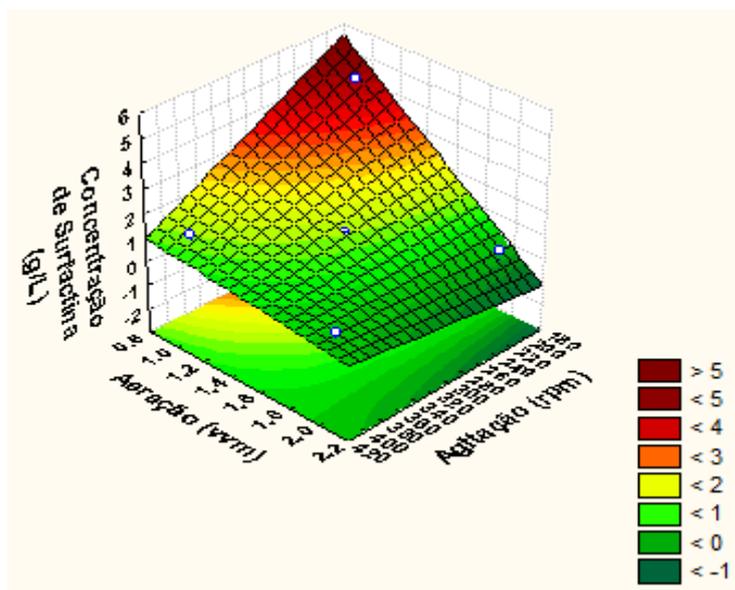


Figura 5.2. Superfície de resposta para concentração de surfactina em função das taxas de agitação e aeração.

5.2 A influência da variável agitação e aeração no sistema integrado

Além da interferência na concentração de surfactina as variáveis agitação e aeração também se mostraram influentes no volume de líquido coletado na fase espuma, resultando na obtenção de diferentes valores de massa recuperada (Tabela 5.3). A espuma produzida foi recolhida em intervalos de uma hora e a variação da concentração de surfactina na espuma foi quantificada, assim também como amostras de seio líquido coletados ao mesmo tempo (Figuras 5.3 a 5.6).

Tabela 5.3. Média de volume coletado e massa total de surfactina recuperada na fase espuma.

Variáveis		Média de volume coletado na fase espuma por hora* (mL/h)	Surfactina recuperada na espuma** (mg)
Agitação	Aeração		
200	1,0	2,6	135
200	2,0	5,6	13
400	1,0	25,5	256
400	2,0	41,0	94
300*	1,5	15,0	24

*Somatório de todos os volumes coletados dividido pelo tempo total da corrida.

**Somatório da massa obtida nas coletas de espuma em cada condição.

Menores perdas de líquido foram observadas para os ensaios realizados nas condições 200 rpm e 1,0 vvm. Foi observado um menor arraste de líquido pela coluna devido à baixa aeração e agitação, levando uma perda média do volume de 2,6 mL/h, o qual resultou na obtenção de um produto de topo muito enriquecido. A massa total de surfactina recuperada para condição foi 135 mg (Tabela 5.3). Chen *et al* (2006) em um trabalho similar de produção de biosurfactante pelo *Bacillus* BBK006 encontrou valores menores de concentração máxima de 2,2 g/L e valor similar a este trabalho de massa de surfactina recuperada 136 mg.

Já para a maior aeração (200 rpm e 2,0 vvm), a perda de líquido pela fase espuma foi relativamente maior devido ao aumento no valor de variável, alcançando um volume médio de líquido perdido de 5,6 mL/h (Tabela 5.3).

Quando os menores valores de ambos os parâmetros foram aplicados (200 rpm e 1,0 vvm) e níveis controlados de espumas foram produzidos, valores altos de concentração foram obtidos durante toda corrida, alcançando um máximo em torno de 28h (4,5 g/L) como pode ser visto na Figura 5.3.

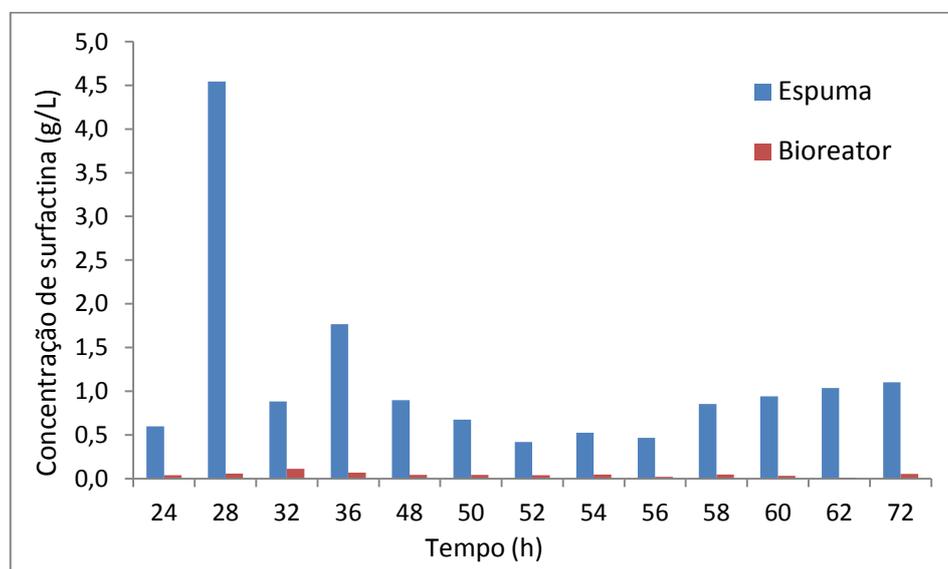


Figura 5.3. Concentração de surfactina na espuma e no bioreator com o tempo nas condições de 200 rpm e 1,0 vvm.

Para as condições de 200 rpm e 2,0 vvm foram obtidos alguns valores de concentrações na espuma menores que no seio líquido no tempo entre 26 horas e 31

horas, devido à ineficiência no processo de concentração provocada pelo arraste de líquido no início da fermentação, o que resultou em uma redução do volume do fermentador, baixa produção e consequente baixa formação de espuma. (Figura 5.4).

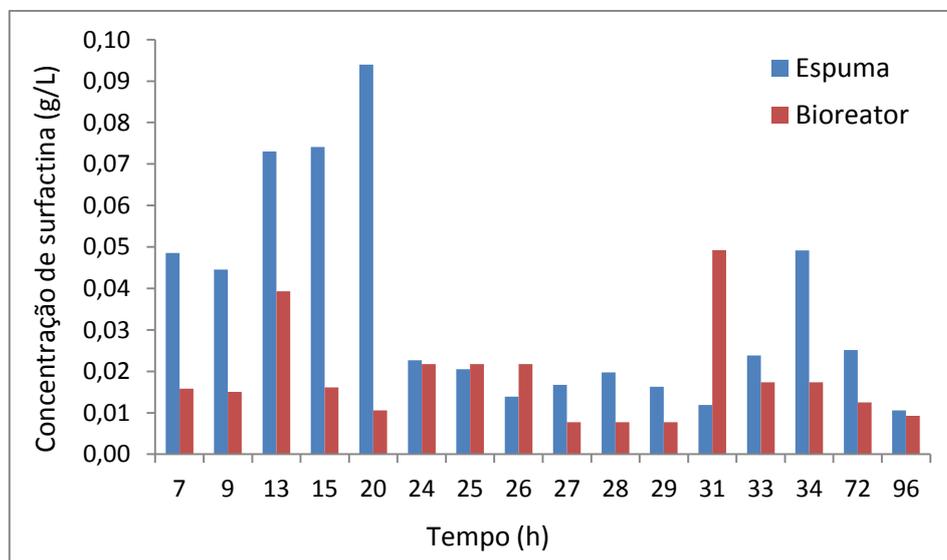


Figura 5.4. Concentração de surfactina na espuma e no bioreator com o tempo nas condições de 200 rpm; 2,0 vvm.

Nas figuras 5.5 e 5.6 são exibidos os perfis de concentração dos ensaios com maior velocidade de agitação nos dois níveis de aeração. Alguns trabalhos reportam que o emprego de altas taxas de agitação e de fluxo de ar não se mostram eficientes para concentrar compostos de superfície ativa. Yeh *et al.* (2006) mencionaram que a aplicação de alta velocidade de agitação influencia a taxa de formação de espuma e, assim, a eficiência da separação surfactina produzida por uma cepa de *Bacillus*, decorrente da instabilidade operacional.

No presente trabalho o mesmo perfil foi observado, quando o processo foi operado a condição de 400 rpm e 2,0 vvm, os níveis máximos agitação e aeração, ocorreu uma produção excessiva de espuma. Isto resultou na perda acentuada do volume da cultura líquida no início da fermentação, levando a redução de quase 50 % do volume do meio de cultura e consequentemente, uma redução no tempo de corrida (Tabela 5.3). Portanto em função deste perfil neste estudo, valores menores de concentrações de surfactina foram obtidos conforme observado na Figura 5.5. A concentração máxima de surfactina alcançada foi de 0,45 g/L após uma hora do início da fermentação e permaneceu quase constante até o término do experimento. Nessa

condição foi gerada uma massa total recuperada na fase espuma de 94 mg (Tabela 5.3). Esse fenômeno pode explicado pela elevada vazão de ar empregada, que aumenta a pressão do sistema, em conjunto com alta agitação, levando a um maior arraste de líquido pela coluna de espuma, dificultando o processo de adsorção e drenagem da espuma na coluna de fracionamento.

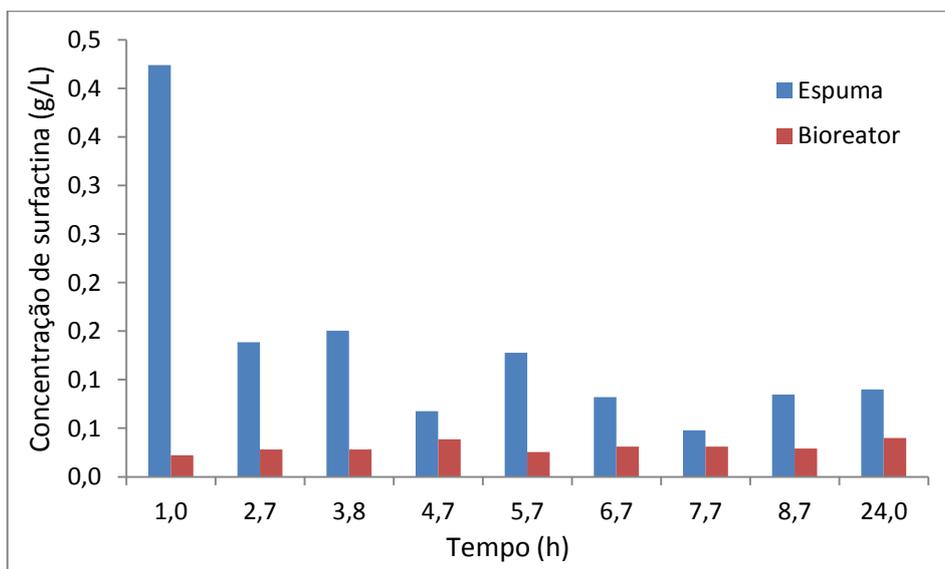


Figura 5.5. Concentração de surfactina na espuma e no bioreator com o tempo nas condições de 400 rpm e 2,0 vvm.

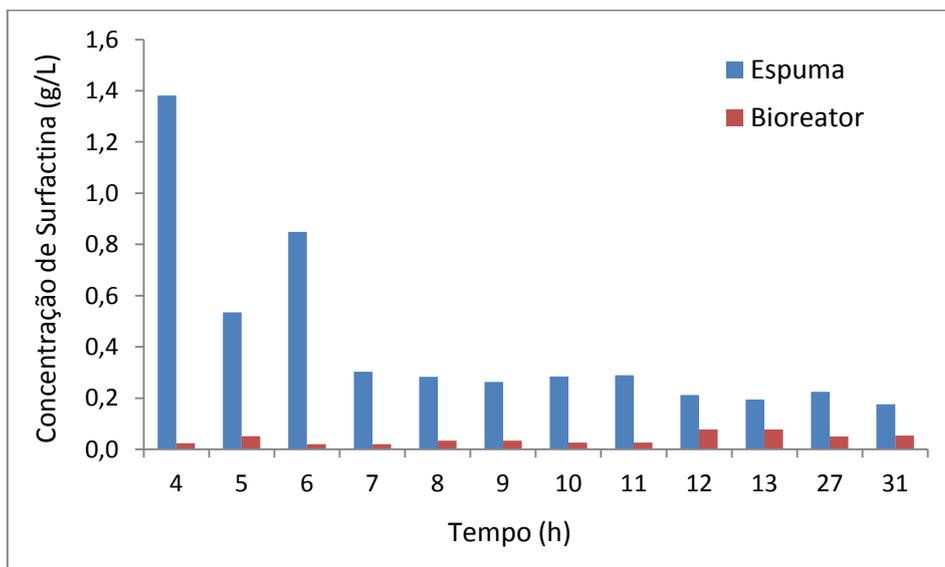


Figura 5.6. Concentração de surfactina na espuma e no bioreator com o tempo nas condições de 400 rpm e 1,0 vvm.

Quando foi operado em 400 rpm e 1,0 vvm (Figura 5.6), uma perda significativa de líquido também foi verificada, devido ao elevado nível de agitação. No entanto, foi obtida uma concentração máxima nessa condição de 1,4 g/L e uma massa recuperada total de surfactina superior a 256 mg. Resultados de massa recuperada encontrados por outros autores foram inferiores 199 mg (CHEN et al., 2006) e 138 mg (DAVIS et al., 2001) quando operado para as melhores condições do processo estudado. Observa-se que apesar do emprego do nível alto da agitação e conseqüentemente uma relativa perda de líquido, foi obtido valores alto de concentração e massa quando o ensaio foi operado em um nível menor de vazão de ar. Isso pode evidenciar a maior influencia da variável aeração nesse sistema.

Por meio da Figura 5.7 pode-se verificar a influência das combinações na perda de volume de líquido e tempo de fermentação. Observa-se que nas condições no qual maiores níveis (400 rpm e 2,0 vvm) foram empregados, perdas acentuadas de líquido foram observadas no início do processo fermentativo. E os maiores volumes de líquido da fase espuma foram obtidos entre 4 e 8 horas, alcançando uma perda máxima de cerca de 250 mL após 5 horas de fermentação. Esse comportamento foi seguido de um decaimento gradual até o final da corrida. Para a condição com a menor aeração (400 rpm e 1,0 vvm) o volume de líquido perdido foi menor, quando comparado ao emprego da maior aeração. Essas perdas foram observadas entre 7 a 10 horas do processo de fermentação, alcançando um máximo de 220 mL. O emprego na menor taxa de aeração reduziu a perda inicial de líquido, o que levou a obtenção de resultados expressivos de concentração em relação à condição com a maior aeração empregada conforme observado na Tabela 5.3.

Essas perdas de líquido geradas em função dessas condições resultou em fermentações com tempos de duração menor, perda de biomassa e nutrientes do meio de produção para a fase espuma, maior cisalhamento entre as células, devido a alta agitação empregada, levando a uma menor síntese de surfactina. Outro fator importante que pode ser considerado foi à transferência de oxigênio.

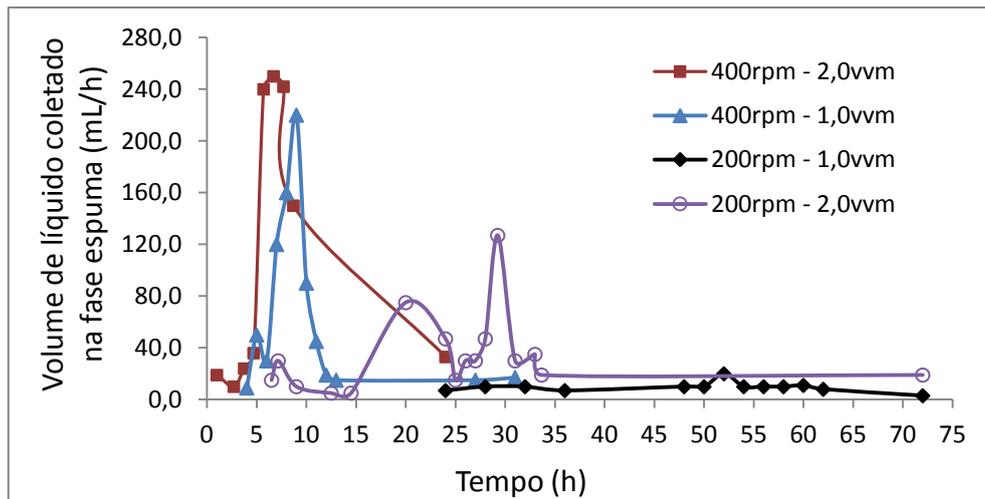


Figura 5.7. O efeito da aeração e da velocidade de agitação no volume de líquido coletado na fase espuma para a cultura do *Bacillus* sp ITP-001 em biorreator com continua coleta de espuma.

Estudos anteriores apontaram que o fornecimento excessivo de oxigênio não foi favorável para a produção de surfactina, decorrentes de altas taxas de agitação e aeração, pois promoveu um crescimento de biomassa e produção de espuma em pouco tempo, resultando em transbordamentos (perdas) do meio de cultura e um curto tempo de fermentação devido à rápida redução de volume de meio (DAVIS *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 1997). Em consequência disso, o processo de concentração tornava-se impossível, uma vez que não mais ascendia espuma pela coluna.

Portanto, pode-se confirmar que o emprego da menor vazão de ar acarreta em um maior tempo de residência das bolhas na coluna de espuma e assim em uma melhor adsorção do biosurfactante na interface das bolhas. O aumento das taxas de drenagem leva a formação de espumas mais secas e estáveis, aumentando a importância da camada de surfactina adsorvida na interface gás-líquido (ROSA, 1996). Além disso, as combinações de elevados níveis não são eficazes nem para a etapa de produção bem como para a etapa de concentração do biosurfactante.

Embora o processo de concentração não tenha sido eficiente para algumas condições empregadas, devido à alta perda de líquido, pode-se observar que este foi satisfatório ao passo que partiam de concentrações baixas no seio líquido e alcançavam concentrações maiores na fase espuma. Diante disso, foi evidenciado que os valores de concentração encontrados neste estudo foram superiores quando comparados com outros trabalhos em condições similares (SINGH E CAMEOTRA, 2004; MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

Isto demonstra que o sistema utilizado para produzir e concentrar surfactina, simultaneamente pela cultura de *Bacillus* sp ITP-001 em bioreator, pode ser considerado um processo eficiente, dependendo das condições empregadas, no qual pode haver uma alta produção de surfactina, e a etapa de concentração eficiente pode ser um potencial para a obtenção de surfactina e futuras aplicações comerciais.

5.3 Influências das variáveis nos valores de recuperação e enriquecimento

Com os valores de concentração de surfactina e dos volumes do produto de topo coletado a partir do colapso da espuma, foi possível determinar valores de recuperação e enriquecimento totais do biosurfactante (Tabela 5.3).

Tabela 5.4. Valores de recuperação e enriquecimento obtidos para concentração de surfactina no sistema integrado em diferentes condições experimentais.

Agitação	Aeração	Média Recuperação surfactina*	Enriquecimento médio**	Enriquecimento e Recuperação máxima	
				R(%)	E
(rpm)	(vvm)	(%)	-		
200	1,0	94,2	28,7	99,3	82
	2,0	82,3	1,4	94,3	8,9
300*	1,5	83,9	5,1	97,1	22
400	1,0	94,7	6,9	98,5	57,2
	2,0	84,8	7,4	97,8	19

$$*Média da recuperação = \Sigma \left(\frac{m_{espuma}}{m_{espuma} + m_{líquido}} \right) \times 100$$

$$**Enriquecimento médio = \frac{\bar{C}_{esp}}{\bar{C}_{líq}}$$

Analisando a Tabela 5.3, foi observado que o maior valor de enriquecimento foi obtido operando em condições de baixa agitação e aeração e foi notado que a concentração do meio para este ponto era relativamente baixa (Figura 5.3). O melhor resultado obtido neste trabalho, operando em condições mínimas das taxas de aeração e agitação, proporcionou um menor arraste de solução do seio de produção para a fase espuma e um maior tempo de residência das bolhas na coluna de espuma, levando a maiores taxas de drenagem, e assim a obtenção de um produto de topo com alta concentração. Diante destas condições experimentais, obteve-se maior valor de

enriquecimento médio, 28,7 vezes, para a surfactina operando em coluna integrada ao meio de produção. Quanto à recuperação do biossurfactante, foram obtidos valores entre 82,3 a 94,7 %. Foi observado que os maiores valores obtidos também foram para ensaios feitos a vazões de ar menores.

Os valores de enriquecimento e recuperação de surfactina obtidos neste trabalho foram melhores ou mesmo próximos em comparação aos valores obtidos nos estudos de Davis *et al.*, (2001) e Chen *et al.*, (2006) para sistemas integrado em condições similares. Davis *et al.*, (2001) obteve uma recuperação de surfactina de 64,4 % a 71,4 % e valores de enriquecimento entre 26 vezes. Por outro lado, nos estudos de Chen *et al.*, (2006), foram alcançados, para um sistema integrado, valores de recuperação de 92,3 % e de enriquecimento pontual para a maior concentração obtida em torno de 50 vezes. Por outro lado, neste estudo, foi observado para a condição no qual se obteve a melhor concentração um enriquecimento pontual de 82 vezes e uma recuperação de 99,3 % (Tabela 5.3).

5.4 Estudos do efeito cinético na produção de surfactina

O perfil de crescimento da biomassa celular, concentração de surfactina e concentração de substrato (amido), em condições ótimas para cultura de *Bacillus* sp ITP-001 são apresentados na Figura 5.8. Foi observada para esta cultura uma tendência de crescimento clássico a partir do consumo de amido, o qual após 24 h foram obtidas concentrações muito baixas desse substrato e o aumento da concentração de surfactina produzida ao longo do tempo alcançou seu valor máximo também em 24 h.

Em geral, isto evidencia a existência de uma relação entre o crescimento microbiano, consumo de amido e a produção de surfactina. A produção do biossurfactante foi iniciada na fase exponencial de crescimento e aumentou significativamente, alcançando uma concentração máxima de surfactina no final da fase exponencial de crescimento para culturas realizadas em condições de 200 rpm e 1,0 vvm. Pode-se dizer que a surfactina produzida pela cultura do *Bacillus* ITP-001 foi um produto associado ao crescimento. A produção associada ao crescimento tem sido reportada por outros autores para *B. Licheniformis* JF-2(LIN *et al.*, 1997), *B.subtilis* ATCC 21332 (DAVIS *et al.*, 1999), *B.subtilis* ATCC 21332 (YEH *et al.*, 2006).

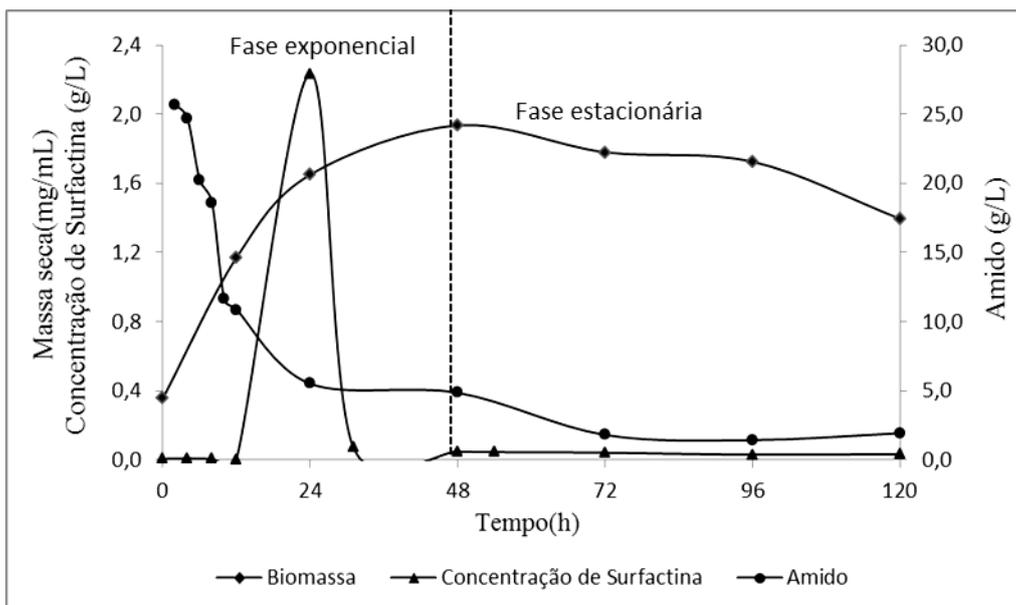


Figura 5.8. Perfil de acumulo de biomassa, consumo de amido e concentração de surfactina em sistema integrado para cultura de *Bacillus* sp ITP-001 em 200 rpm e 1,0 vvm.

A fim de obter informações sobre o processo de produção, alguns parâmetros como taxa específica de crescimento (μ), taxa específica de consumo de substrato (q_s) e formação de produto (q_p) e fatores de rendimento de biomassa em produto e substrato em produto ($Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$) foram investigados para a condição de máxima produção de surfactina encontrada (200 rpm e 1,0vvm).

A cultura começou a produzir surfactina a partir de 12 h (fase exponencial) e a concentração de surfactina alcançou um máximo de 2,3 g/L em 24 h. O rendimento ($Y_{p/s}$) foi de 116,46 g/g, acompanhado de um rendimento de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) de 0,146 g/g. Esses resultados foram elevados, comparado com a produção de surfactina por outras culturas em que a concentração máxima obtida foi de 136 mg/L e os rendimentos encontrados foram de $Y_{p/s} = 0,068$ g/g e $Y_{x/s} = 0,26$ g/g em condição similares (CHEN *et al.*, 2006). Os fatores de rendimento indicam a eficiência da produção e são importantes parâmetros de otimização em processos comerciais. Desta forma, os resultados aqui obtidos podem ser considerados suficientes para uma produção potencial de surfactina, pois esta acima de alguns valores já reportados.

A taxa específica de crescimento (μ) obtida para estas condições com o *Bacillus* sp ITP-001 foi de 0,042/h. Esta taxa de crescimento resultou alto nível de surfactina, o qual sugere que esta cultura foi adequada para fermentação para produção de surfactina. A taxa de crescimento específico é um dos mais importantes parâmetros do processo, pois representa a dinâmica do comportamento do micro-organismo durante

a fermentação e para a cultura *Bacillus* deste trabalho houve uma condição metabólica desejável, resultando em altas produções e assim através do sistema integrado a obtenção de produtos mais enriquecido. Os valores de q_s e q_p foram, respectivamente, 0,285 g/g.h e 33,14 g/g.h.

5.5 Caracterização do biosurfactante produzido por *Bacillus* sp ITP-001.

Neste tópico foram avaliadas as características da surfactina produzida pelo *Bacillus* sp ITP-001 quanto as atividades antimicrobianas e emulsificantes.

5.5.1 Atividade anti-microbiana

Diversos estudos têm reportando o potencial antimicrobiano de muitos biosurfactantes, como ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Hamme *et al.*, 2006), lipopeptídeos produzidos por gêneros de *Bacillus* (Singh *et al.*, 2004) e glicopeptídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* (Muthusamy *et al.*, 2008). Os biosurfactantes têm muitas aplicações na saúde e por esta razão os micro-organismos alvos (*E. coli* CCT-0355, *S. aureus* ATCC-6533, *Fusarium* sp LM03, *C. albicans* ATCC-76645) foram selecionados. Há uma relação destes micro-organismos com os mais importantes problemas na saúde pública como os distúrbios gastrointestinais (diarréia) promovidos pela bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Geralmente estes problemas estão associados à ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos tóxicos como a bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e o fungo filamentoso (*Fusarium* sp), sendo a maior causa de morbidade e uma seria causa de morte em todo mundo. Já a levedura *Candida albicans* está presente na cavidade bucal de crianças e tem ação no desenvolvimento inicial de candidíase (FAGUNDES e SCALETSKY, 2000; SILVA *et al.*, 2009).

Os dados relativos à atividade antimicrobiana do biosurfactante produzido neste estudo por *Bacillus* sp. ITP-001 são apresentados na Tabela 5.5.

Estes dados foram obtidos através de testes de inibição para diferentes micro-organismos patogênicos avaliados em diferentes concentrações de surfactina (2,3 g/L; 1,5 g/L, 1,1 g/L, 0,9 g/L). Os valores observados são expressos como o diâmetro das zonas de inibição contra os patógenos bacterianos selecionados.

Tabela 5.5. Efeito antimicrobiano de amostra de surfactina produzida por cultura do *Bacillus* sp ITP-001 recolhidos em espuma de fase na condição 200 rpm e 1,0 vvm.

Concentração de Surfactina	Halo de inibição de crescimento (mm)			
	<i>E. coli</i> CCT-0355	<i>S. aureus</i> ATCC-6533	<i>C. albicans</i> ATCC-76645	<i>Fusarium sp</i> LM03
Tetraciclina ^a (50µg/mL)	18,6 ± 0,17	14,0 ± 0,10	-	-
Cetoconazol ^a (50µg/mL)	-	-	13,6 ± 0,11	11,0 ± 0,08
NaCl 0,9%	0	0	0	0
Concentrado (4,5g/L)	18,0 ± 0,11	-	16,9 ± 0,21	17,0 ± 0,04
2,3g/L	11,0 ± 0,01	-	14,7 ± 0,18	13,0 ± 0,18
1,5g/L	7,3 ± 0,14	-	11,3 ± 0,18	11,4 ± 0,07
1,1g/L	5,6 ± 0,04	-	8,0 ± 0,11	10,2 ± 0,14
0,9g/L	4,0 ± 0,04	-	5,1 ± 0,07	8,6 ± 0,14

- não determinado

^a controle positivo

Amostras coletadas na fase espuma na melhor condição empregada (200 rpm e 1,0 vvm) foram usadas para estes testes. É claramente evidente a partir da tabela, que o biosurfactante obtido possui atividades inibitórias diferenciadas dependendo da concentração e do micro-organismo alvo empregado.

Os resultados exibem que o *S. aureus* ATCC-6533 não foi provocado pela surfactina produzida. Joe *et al.* (2012) em seu trabalho avaliou a atividade antimicrobiana de surfactina em alguns micro-organismos patogênicos e também não foi encontrado nenhum efeito para a cepa de *S. Aureus* em alguns dos seus ensaios. Por outro lado, foi observada atividade inibitória contra *E coli* CCT-0355 com halo de inibição de 18 mm. Yalçın e Ergene (2009), em seu trabalho encontrou resultado similar, no qual o biosurfactante produzido mostrou elevada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas comparadas com Gram positivas.

Os outros micro-organismos estudados (*Fusarium sp* LM03 e *C. albicans* ATCC-76645), quando a maior concentração foi empregada diâmetros de halos de inibição semelhantes foram obtidos (17 mm, 16,9 mm) respectivamente, e foi observado que os halos de inibição para os fungos, promovido pelo biosurfactante, foi maior aos apresentados pelo controle positivo, até as concentrações de 2,3 g/L (*Candida albicans*) e 1,5 g/L (*Fusarium sp*). Dessa forma, foi demonstrado uma melhor atividade fungicida,

devido ao diâmetro dos halos de inibição serem maiores para o *Fusarium* sp, (5,1mm) e *C. Albicans* (8,6 mm) nas concentrações mais baixas.

Como foi observado na Tabela 5.5, à medida que foi aumentada a concentração de surfactina, observou-se um aumento do efeito tóxico para todos os micro-organismos e, além disso, para a *Candida albicans* ATCC-76645 foi observado o efeito “cut off”. Tal efeito baseia-se que para uma determinada concentração de surfactina, a toxicidade não pode ser mais aumentada, se tornando constante (Figura 5.9).

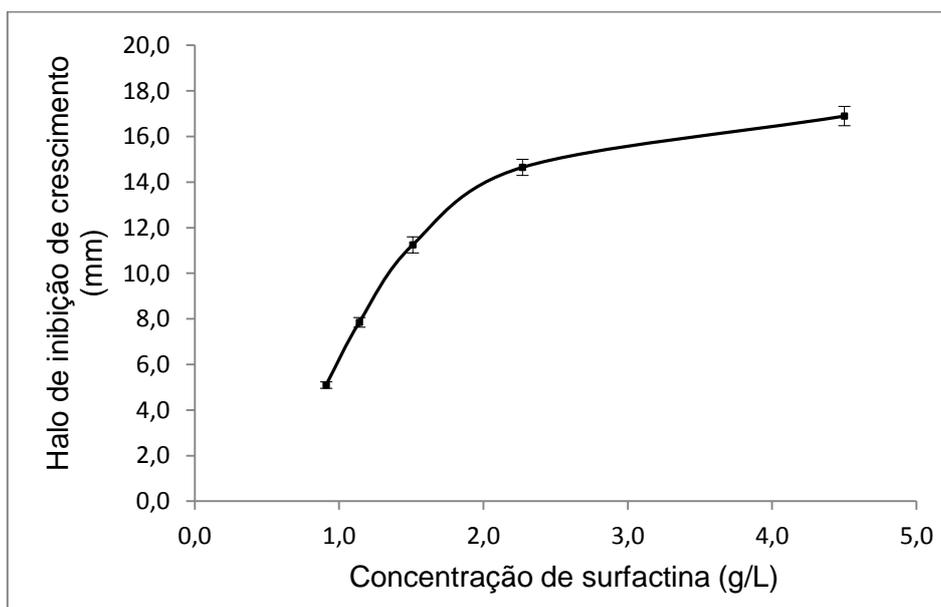


Figura 5.9. Halo de inibição de crescimento em função de concentrações de surfactina para *Candida albicans* ATCC-76645.

A variação dos efeitos observados nos micro-organismos estudados difere devido aos aspectos morfológicos. Uma explicação possível para as diferenças quanto à sensibilidade bacteriana, pode esta relacionada à diferença na estrutura da parede celular das bactérias (VENTURA *et al.*, 2012). As bactérias denominadas Gram-positivas tem uma espessa parede celular de múltiplas camadas que consiste principalmente de peptidoglicano em torno da membrana citoplasmática, já a parede celular de bactérias Gram-negativas, contém duas camadas, externa à membrana citoplasmática e o peptidoglicano em torno da membrana citoplasmática (SALYERS E WHITT, 2001).

Já no que diz respeito à comparação entre a levedura e os fungos filamentosos, de um modo geral, observa-se que o último é o micro-organismo mais sensível. Em função das suas características morfológicas, realçando uma cápsula

protetora da levedura, que é responsável pela proteção do microrganismo (VENTURA *et al.*, 2012).

5.5.2 Atividade emulsificante

Os biosurfactantes podem ser caracterizados por suas propriedades emulsificantes. Estas propriedades são discutidas em termos de estabilidade emulsificante (ES) e atividade emulsificante (EA). Ensaios de atividade emulsificante foram realizados na temperatura de 25° C e pH 7,0 para diferentes óleos e os resultados obtidos são exibidos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 Atividade emulsificante do biosurfactante produzido pela cultura de *Bacillus* sp ITP-001 para diferentes óleos vegetais e minerais à 25°C e pH 7,0.

Óleos Vegetais	EA (U)	Óleos Minerais	EA (U)
Oliva	1,75	Tolueno	1,45
Coco	1,90	Querosene	0,22
Milho	1,13	Xileno	0,60
Soja	0,69	Óleo mineral	0,28
Girassol	0,04	Tolueno (35°C)	2,13
Canola	0,27		
Oliva (35°C)	0,77		

Por meio dos resultados observou-se para o óleo de coco a maior atividade emulsificante (1,90 U), seguida de óleo de oliva (1,75 U), o tolueno (1,45 U) e o óleo de milho (1,13 U). Esses foram os mais eficientemente emulsificados em relação aos analisados.

Quando foi aplicada outra condição (pH 7,0 e 35° C) para o tolueno e o óleo de oliva, observou-se um aumento no valor da EA para o tolueno de 2,13 U. Porém, para a óleo de oliva houve uma redução no resultado obtido para quando comparado a menor temperatura de 0,77 U. Isso pode evidenciar a influência da temperatura nas propriedades de emulsificação como foi reportado por Lima e Alegre (2009).

Os valores de estabilidade emulsificação foram quantificados em termos do tempo em que a fração de óleo foi separada. A habilidade do caldo coletado na fase

espuma em emulsionar e estabilizar emulsão água/óleo para diferentes os óleos utilizados são mostrados na Figura 5.10.

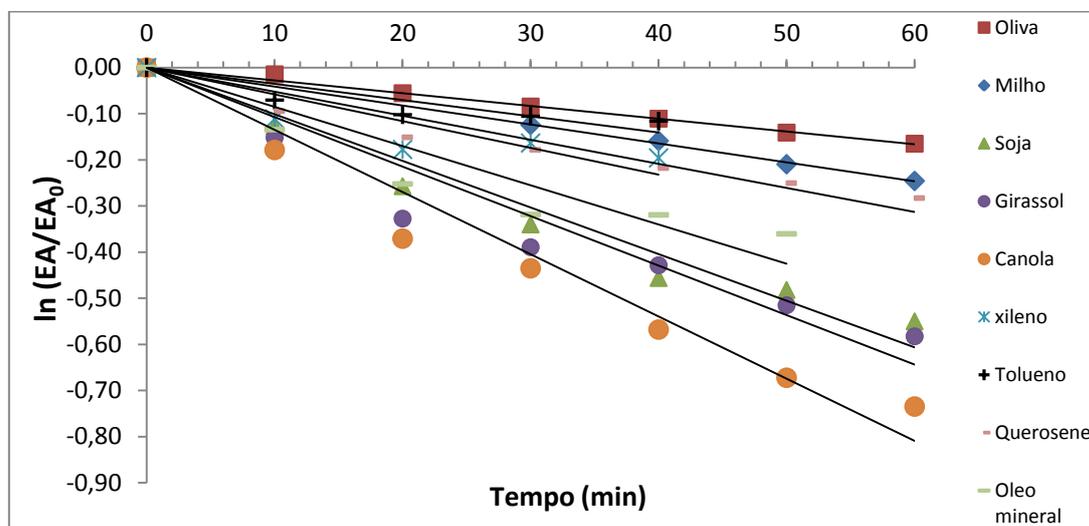


Figura 5.10. Estabilidade emulsificante da surfactina produzida por *Bacillus* sp. ITP-001 em emulsão água-óleo de diferentes óleos a 25°C e pH 7,0.

Foi observado que a atividade de emulsificação reduziu com o tempo e que o biosurfactante produzido por *Bacillus* sp ITP-001 emulsiona e estabiliza emulsões óleo em água de acordo com uma cinética de primeira ordem. Para cada óleo verificou-se uma redução diferente na taxa de emulsão e foram obtidos diferentes constantes de decaimento.

Em relação ao efeito do biosurfactante na estabilidade de emulsão, os resultados mostraram que em emulsões óleo-água, os óleos vegetais apresentaram as maiores ES dentre todos os testados (Figura 5.11 e 5.12).

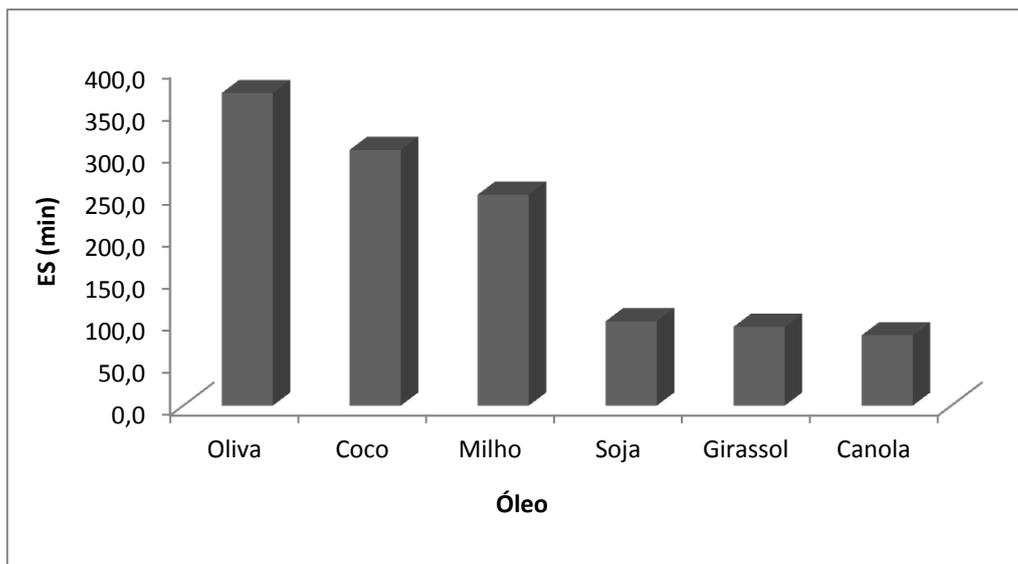


Figura 5.11. Estabilização de emulsão óleo em água pela surfactina a partir do *Bacillus* sp ITP-001 em pH 7,0 e 25°C para óleos vegetais.

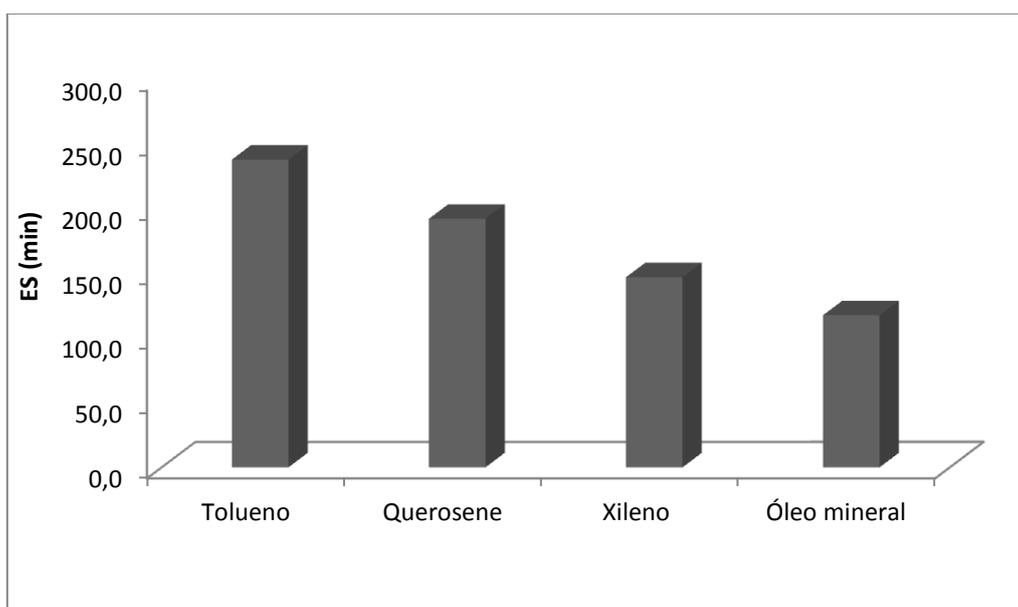


Figura 5.12. Estabilização de emulsão óleo em água pela surfactina a partir do *Bacillus* sp ITP-001 em pH 7,0 e 25°C para óleos minerais.

No estudo conduzido em (pH 7,0 e 25°C), os maiores valores de estabilidade emulsificante ocorrem nas emulsões utilizando óleo vegetal (Figura 5.11). O melhor valor de ES foi encontrado para óleo de oliva (370,4 min), seguido de óleo de coco (303,0 min) e milho (250,0 min). Em estudo feito por Lima e Alegre (2009) para estabilidade de emulsão de um biosurfactante produzido por *Saccharomyces lipolytica*

CCT-0913 mostra que o biosurfactante obtido foi mais efetivo para óleos vegetais (> 400 min), obtendo melhor resultado para óleo de oliva em pH 7,0 e 60° C.

Para os hidrocarbonetos o tolueno mostrou uma maior estabilidade (238,1 min) em relação aos analisados, seguido do querosene (192,3 min) (Figura 5.12). Esses valores de hidrocarbonetos foram altos em relação ao encontrados em outro trabalho que estiveram na faixa de 50 min < ES < 100 min (LIMA E ALEGRE, 2009).

A estabilidade emulsificação dos óleos de oliva e o tolueno foram testados para a temperatura de 35° C e pH 7,0. O resultado obtido mostrou um aumento na ES para o tolueno (277,0 min) e uma redução para o óleo de oliva (104,2 min), sugerindo que o aumento da temperatura tem efeitos distintos para cada tipo de matriz hidrofóbica empregada.

A variação nos resultados obtidos para os óleos vegetais pode esta relacionada com a composição dos óleos em termos de ácidos graxos (Tabela 5.7). Para os óleos com composição em ácidos graxos com menores numero de carbonos (C₁₂, C₁₄, C₁₆) foram verificados os melhores valores de estabilidade (oliva e coco). No entanto, para os demais óleos (milho, soja, girassol e canola), no quais houve predominância na sua composição de ácidos graxos com maior número de carbonos (C₁₈), os valores de estabilidade foram menores.

Tabela 5.7 Composição de ácidos graxos dos óleos.

Óleo	Composição de ácidos graxos						
	Láurico C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Mirístico C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Palmítico C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Estearico C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Oléico C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Linoléico C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Linolênico C ₁₈ H ₂₈ O ₂
Oliva	-	1,3	16	3,3	64	15	-
Coco	51	18,5	11	3	8,2	2,6	-
Milho	-	-	7	3	43	39	-
Soja	-	-	11	6	31	51,5	10,5
Girasso	-	-	6,5	3	43	68	-
1							
Canola	-	0,2	6,5	3	51	30	13

Fonte: ANVISA

A diferença na estabilidade para os hidrocarbonetos pode esta atribuída a estrutura química dos compostos empregados. O tolueno (C₇H₈) tem uma estrutura

química mais simples quando comparado ao xileno (C₈H₁₀). Já o querosene, apesar de ter uma cadeia carbônica relativamente grande (C₉ à C₁₆), é uma mistura, no qual a sua maioria de seus compostos são saturados, o que possivelmente justifica o seu alta estabilidade. Em relação ao óleo mineral que também é uma mistura, há uma proporção maior de parafinas, predominando grandes cadeias carbônicas (n° carbono > 20).

Os resultados obtidos foram suficientes para afirmar que o composto produzido (surfactina a partir de *Bacillus* sp ITP-001), pode ser usado para diversas aplicações como biorremediação, lavagem de solos contaminados por petróleo reportado por vários autores (SATHISHKUMAR *et al.*, 2008; PERFUMO *et al.*, 2010), pois possui alta atividade de emulsificação e estabilidade de emulsão para diferentes emulsões óleo/água.

6. CONCLUSÕES

A integração de um biorreator de tanque agitado e aerado com uma coluna de recuperação de espuma para a cultura de *Bacillus* sp. ITP-001 foi aqui aplicada com sucesso para a produção e concentração simultânea de surfactina. A eficiência do processo foi altamente dependente das taxas de agitação e aeração aplicadas. As duas variáveis foram significativas, podendo a variável aeração ser mais influente no processo integrando biorreator e coluna de fracionamento. Em sistemas operados a taxas mais elevadas de agitação e aeração (400 rpm e 2,0 vvm), quantidades excessivamente altas de espuma foram produzidas o qual resultou, em perdas significativas de líquido a partir de bioreator, alcançando um máximo de 250 mL/L, o qual levou, a obtenção de produto menos concentrado gerando um baixo valor de enriquecimento, e recuperação de surfactina. Com o emprego de condições experimentais mais amenas (200rpm e 1,0vvm), excelentes resultados foram obtidos. A máxima concentração obtida foi de 4,5 g/L, gerando uma massa recuperada de 135 mg. Nesta condição o valor médio de enriquecimento de surfactina foi de 28,7 que foi o maior entre todos os experimentos realizados. Os maiores valores de recuperação alcançados foram entre 82,3 a 94,7 %. Os valores máximos obtidos (94,7 % e 94,2 %) foram para sistemas operados em 400 e 200 rpm, respectivamente, mantendo a aeração mínima de 1,0 vvm.

Dados cinéticos demonstraram que a que houve um alto valor de rendimento de produto a partir do substrato (Y_p/x), apesar do baixo rendimento deste em biomassa (Y_x/s), o que pode ser atribuído ao fato da surfactina ser um produto do metabolito secundário. A concentração máxima de surfactina foi atingida com 24 h (entre fase exponencial e estacionaria), quando alcançou 2,3 g/L , sendo sua produção associada ao crescimento. A obtenção de altos valores indicam que a surfactina foi eficientemente por cultura de *Bacillus* sp ITP-001 em biorreator.

A caracterização do biosurfactante produzido foi feita a partir de testes de atividade antimicrobiana e emulsificante. Em teste de atividade antimicrobiana foi observado que surfactina produzida foi capaz de inibir o crescimento de alguns microorganismos patogênicos (*E coli* CCT-0355, *Fusarium* sp LM03 e *C. albicans* ATCC - 76645) com halos de inibição de 18 mm, 17 mm 17 mm, respectivamente para as concentrações mais altas de surfactina. Foi verificada, a partir dos resultados, uma maior ação deste composto como ativos para os fungos, pois houve halos de inibição

superior nas concentrações mais baixas quando comparados com outro micro-organismo empregado.

Ensaio de atividade emulsificante feitos para obter informações sobre o poder de emulsificação do biosurfactante. De acordo com resultados encontrados foi verificado que a surfactina produzida apresenta diferentes perfis e valores de atividade emulsificante e estabilidade emulsificante para óleos vegetais e minerais em emulsões óleo-água, no qual os maiores valores de estabilidade foram observados para os óleos vegetais. Os maiores valores encontrados foram de 370,4 min, 303 min e 250,0 min, para óleo de oliva, coco e milho, respectivamente. Dentre os hidrocarbonetos estudados o tolueno foi obteve o maior valor de estabilidade emulsificante (238,1 min).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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*. v.75, p. 209-214, 2010.

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

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*, v.31, p.488-494, 1968

BADER, R.; SCHULTZ, F. **Fractionation by adsorption and crystallization on foam, part III, experiments with bile salts.** *Transactions of the Faraday Society*, v.42, p.571-576, 1946

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.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v.87, p.427-444, 2010.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. **Potential commercial applications of microbial surfactants.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, p.495-508, 2000.

BANAT, I.M. **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A Review.** *Bioresource Technology*, v.51, p.112, 1995.

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

BARROS, F.F.C.; QUADROS C.P.; PASTORE G.M. **Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira.** *Ciência. Tecnologia de Alimentos.*, Campinas, v.28(4), p.979-985, 2008.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. **Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source.** *Journal of Food Engineering*, v.54, p.283-288, 2002.

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

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* v.72, p. 248-254, 1976

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acesso em 26/01/2013.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil, 2008.

BUENO, S. M.; SILVA, A.N.; CRUZ, C.H.G. **Estudo da produção de biossurfactantes em caldo de fermentação.** *Química Nova*. v. 33, No. 7, p. 1572-1577, 2010.

CAMEOTRA,S.S.;MAKKAR,R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, p.262-266, 2004.

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

CHEN, H.; JUANG, R. **Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction.** *Biochemical Engineering Journal*, v.38, p.39-46, 2008a.

CHEN, L. H.; CHEN, Y. S.; JUANG, R.S. **Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process.** *Separation and Purification Technology*. v.59, p. 244-252, 2008b.

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

CHTIOUI, O.; DIMITROV, K.; GANCE, F.; NIKOV, I. **Biosurfactants production by immobilized cells of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 and their recovery by pertraction.** *Process Biochemistry*, v.45, p.1795-1799, 2010.

COLLA, L. M. COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. Rio Grande. Universidade de Passo Fundo, 2003.

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

COSTA, L.O.O. **Purificação de saponinas de extratos de quilaia usando fracionamento em coluna de espuma.** Tese de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1999.

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

DALTIN D. **Tensoativos - Química, propriedade e aplicações.** Blucher, Capítulo 9: Espumas, p. 280, 2011.

DARVISHI, P.; AYATOLLAH, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. **Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2,** 2011.

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*, v.28, p.346-354, 2001.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. **The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism.** *Enzyme and Microbial Technology*. v.25, p. 322- 329, 1999.

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

EVANS; FENNELL; STOKES, R. *Fundam. Interf Eng*, Wiley, Canada, 1997.

FAGUNDES NETO, U., & SCALETSKY, I. C. A. **The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition.** *Sao Paulo Medical Journal*, v.118 (1), p.21–29, (2000)

FIGUEREDO, R.C.R.; RIBEIRO, F.A.L.; SABADINI, E. **Ciência de espumas: aplicação na extinção de incêndios.** *Química Nova*, v.22, n.1, p. 126-130, 1999.

FIECHTER, A. **Biosurfactantes: moving towards industrial application.** *Trends in Food Science and Technology*, n. 31, p. 283-293, 1992.

FINNERTY, W.R. **Biosurfactants in environmental biotechnology.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.5, p.291-295, 1994.

FLORENCE, A.T.; ATWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.** Tradução: EDUSP, Cap. 6: *Tensoativos*, p. 279-289, 2003.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A.K. **Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696).** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 324, p.172–176, 2008.

HAMME, J.D.V, A. SINGH, O.P. WARD, **Physiological aspects. Part 1. In a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology,** *Biotechnology Advances*.v. 24, p. 604, 2006.

HEYD, M.;A. KOHNER, T.H. TAN, M. NUSSER, KIRSCHHÖFER, F.; BRENNER-WEISS, G. FRANZREB M.; BERENSMEIER S. **Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example.** *Anal Bioanal Chemistry* v.391, p.1579–1590,2008.

HOLMBERG, K. **Natural surfactants.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v.6, p. 148-159, 2001.

ISA, M.H.M.; CORAGLIA D. E; FRAZIER, R. A.; JAUREGI, P. **Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process.** *Journal of Membrane Science*. v.296, p.51–57, 2007.

ISA, M.H.M.; FRAZIER, R.A.; JAUREGI, P. **A further study of the recovery and purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration.** *Separation and Purification Technology* , v.64, p.176–182, 2008.

JARVIS, F.G., JOHNSON, M.J. **A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of the American Chemical Society*, v.71, p.4124, 1949.

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

- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A.J. **Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B.** *Bioresource Technology*, v.99, p.4603–4608, 2008
- JUNKER B. **Foam and its mitigation in fermentation systems.** *Biotechnology Progress*. v.23, p.767–784, 2007
- KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. **Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.84, p.41-46, 1997.
- KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE P.; ZIESSOW, D. **Separation and Characterization of Surfactin Isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105.** *Journal of colloid and interface science*, v.204, p.1–8, 1998.
- KRACHT, M.; ROKOS H.; OZEL M.; KOWALL M., PAULI G., VATER J., **Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives,** *Journal. Antibiotics*. v.52, p. 613-619, 1999.
- KREPSKY, N. **Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos.** Tese de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, 2004.
- LANG, S. **Biological amphiphiles (microbial surfactants).** *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.7, p.12-20, 2002.
- LIMA, Á.S.; ALEGRE, R.M. **Evaluation of emulsifier stability of biosurfactant produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v.52, p.285-290, 2009.
- LIN, S.C. **Biosurfactants: recents advances.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.66, p.109-120, 1996.
- LUCENA, SÉRGIO LUIZ DE. **Efeito do refluxo externo no fracionamento de soluções diluídas de proteínas em colunas de bolhas e espuma.** Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1995.
- MAIER, R.M. **Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria.** *Advances in Applied Microbiology*, v.52, p.101-121, 2003.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Anupdate on the Use of Unconventional substrates for Biosurfactant Production and their New Applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. A review.** *AMB Express*, v.1, p.5, 2011.

MANIASSO, N. **Ambientes micelares em química analítica.** *Química Nova*, v.24, n.1, p.87-93, 2001.

MARTIN, P.J.; DUTTON, H.M.; WINTERBURN, J.B.; BAKE, S.; RUSSELL, A.B. **Foam fractionation with reflux.** *Chemical Engineering Science*, v.65, p.3825–3835, 2010.

MEIRA, J. A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos.** Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2007.

MERZ, J.; BURGHOFF, B.; ZORN H.; SCHEMBECKER, G. **Continuous foam fractionation: Performance as a function of operating variables.** *Separation and Purification Technology* , Accepted Manuscript, 2011.

MORÁN, A.C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SIÑERIZ, F. **Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* 09.** *Biodegradation*, v.11, p.65-71, 2000.

MYERS, D. **Surfactant Science and Technology.** New York : VCH , 1988. 325 p.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F., **Recovery of biosurfactant by ultrafiltration,** *Journal Chemical Technology Biotechnology*. V. 47, p. 23–29, 1990

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

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

MULLIGAN, C. N. **Recent advances in the environmental applications of biosurfactants.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.14, p.372–378, 2009.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. **Biosurfactants: properties, commercial production and application.** *Current Science*, v. 94, no. 6, 2008.

NAJAFI, A.R.; RAHIMPOUR, M.R.; JAHANMIRI, A.H.; ROODTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; GHOBADI, Z. **Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology.** *Chemical Engineering Journal*, v.163, p.188-194, 2010.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. **Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações.** *Quimica Nova*. v. 25, No. 5, p. 772-776, 2002.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. **Biosurfactants in food industry.** *Trends in Food Science & Technology*, v.18, p.252-259, 2007.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT R., BANAT, I. M. **Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates.** *Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifier* School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Coleraine, County Londonderry, Northern Ireland, UK. V.47, p.1503-1510, 2010.

PERNA, R. F. **Fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma.** Tese de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2010.

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

QU, Y-H.; ZENG, G-M.; HUANG, J-H.; XU, K.; FANG Y-Y.; LI, X.; LIU H-L. **Recovery of surfactant SDS and Cd²⁺ from permeate in MEUF using a continuous foam fractionator.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 155, p. 32–38, 2008.

REIS, ROBERTA CRISTINA NOVAES DOS. **Síntese de surfactantes derivados da D-ribonolactona.** Tese de Mestrado. Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil, 2007.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; MEI H. C.; OLIVEIRA, R. **Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v.53, p.105–112, 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*, v.24, n.1, p.1-14, 2007.

SALATI, S.; PAPA, G.; ADANI, F. **Perspective on the use of humic acids from biomass as natural surfactants for industrial applications.** *Biotechnology Advances*, 2011.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D., 2001. **Structural features of prokaryotes.** In: Fitzgerald (Ed.), *Microbiology: Diversity, Disease, and the Environment*. Science Press, Bethesda, Maryland, p.51–68.

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*, v.101 p. 324–330, 2010.

SATHISHKUMAR M.; BINUPRIYA A.R.; BAIK S.; YUN S. **Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas,** *Clean*, v.36, p.92–96, 2008

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. **Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin.** *Process Biochemistry*, v.40, p.2953–2958, 2005.

SEN, R. **Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v.34, p.714–724, 2008.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. **Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications.** *Central European Journal of Medicine*, v.3, n.2, p.123-133, 2008.

SILVA, K. R., RODRIGUES, S. A., XAVIER FILHO, L., LIMA Á. S. **Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains.** *Applied Biochemistry Biotechnology*. v. 152 , p. 316–325, 2009.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. **Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences.** *Trends in Biotechnology*, v.22, p.142-146, 2004.

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

SOBRINHO, H.B.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; TAKAKI, G.M.C.; LEITE, L.F.C.; SARUBBO, L.A. **Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995.** *Process Biochemistry*, v.43, p.912–917, 2008.

SOCCOL, C.R., B. MARIN, M. RAINBAULT, J.M. LEBEAULT, **Breeding and growth of Rhizopus in raw cassava by solid state fermentation**, *Appl Microbiol Biotechnol*, v.41, 1994.

TADROS, T. F. **Applied Surfactants: Principles and Applications**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

VENTURA, S. P. M.; BARROS, R.F.; SINTRA, T.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. **Simple screening method to identify toxic/non-toxic ionic liquids: Agar diffusion test adaptation**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 83, p. 55–62, 2012.

VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. **Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis***. *Biologicals*, v.25, p.289-297, 1997.

VAN BOGAERT I, SAERENS K, DE MUYNCK C, DEVELTER D, SOETAERT W, VANDAMME E. **Microbial production and application of sophorolipids**. *Applied Microbiology Biotechnology* v.76, p.23–34, 2007.

WEISSENBORN, P. K; PUGH, R.J. **Surface tension and Bubbles Coalescence Phenomena of aqueous solutions of electrolytes**. *Langmuir*, v.11, p. 1422-1426, 1995.

WINTERBURN, J.B.; MARTIN, P.J.; RUSSELL, A.B.; **Recirculating biosurfactant foam stripper for integration with industrial fermenters**. Special Abstracts. *Journal of Biotechnology*. v.150S, p.S1–S576, 2010.

WINTERBURN, J.B.; RUSSELL, A.B.; MARTIN, P.J. **Characterisation of HFBII biosurfactant production and foam fractionation with and without antifoaming agents**. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.90, p.911–920, 2011.

YALÇIN, E.; ERGENE, A. Screening the Antimicrobial Activity of Biosurfactants Produced by Microorganisms Isolated from Refinery Wastewaters. *Journal of Applied Biological Sciences*, v. 3(2), p.163-168, 2009.

YEH, M.S., WEI, Y.H., CHANG, J.S. **Bioreactor desing for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis***. *Process Biochemistry*, v. 41, p.1799–1805, 2006.

8. ANEXOS

8.1 Curva padrão de surfactina

A seguir apresenta-se um exemplo de obtenção da curva analítica para a determinação da concentração de surfactina a partir de medidas de tensão superficial, aplicando-se o método de placa de Wilhelmy. Na Tabela 9.1 são apresentados os dados utilizados para a obtenção da curva analítica.

Tabela 8.1. Curva analítica de concentração de surfactina em função da tensão superficial.

C (mg/L)	C (mol/mL)	ln C (mol/cm ³)	Tensão superficial (mN/m)
0	0	-	71,72
2	1,9305E-09	-20,07	63,330
4	3,861E-09	-19,37	56,788
6	5,79151E-09	-18,97	54,115
8	7,72201E-09	-18,68	49,024
12	1,1583E-08	-18,27	47,575
16	1,5444E-08	-17,99	41,994
20	1,9305E-08	-17,76	39,434

