



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Programa Oficial de Doctorado en Química



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química

TESIS DOCTORAL

Título de la tesis en español:

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES OBTENIDOS POR LINAJES DE *Bacillus sp.* AISLADAS DE ESTACIONES DEL TRATAMIENTO DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y DEL SUELO DE MANGLAR (BRASIL).

Título de la tesis en portugués:

“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES OBTIDOS POR LINHAGENS de *Bacillus sp.* ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS E DE SOLO DE MANGUEZAIS (CEARÁ - BRASIL)”

Realizada por

DARLANE WELLEN FREITAS SOARES

Dirigida por

Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Universidad Federal de Ceará, Brasil)

Dra. Deisi Altmajer Vaz (Universidad de Granada, España)

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Darlane Wellen Freitas Soares
D.L.: GR 2275-2014
ISBN: 978-84-9083-336-0

DARLANE WELLEN FREITAS SOARES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES OBTIDOS POR
LINHAGENS de *Bacillus sp.* ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
ÁGUAS RESIDUAIS E DE SOLO DE MANGUEZAIS (CEARÁ - BRASIL)**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR – Espanha) para obtenção do Grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Processos biotecnológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Deisi Altmajer Vaz (Universidade de Granada – UGR - Espanha)

La doctoranda **DARLANE WELLEN FREITAS SOARES** y los directores de la tesis **LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES** (Universidad Federal de Ceará, Brasil) y **DEISI ALTMAJER VAZ** (Universidad de Granada)

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Fortaleza, 08 de junio de 2014.

Granada, 16 de junio de 2014.


Fdo.: Luciana Rocha Barros Gonçalves

Directora de la Tesis


Fdo.: Deisi Altmajer Vaz

Directora de la Tesis

Fortaleza, 08 de junio de 2014.


Fdo. Darlane Wellen Freitas Soares

Doctoranda

À Deus.

*Ao meu marido Carlos, meu filho Carlos
Diogo, meus pais, Dalva e Joaquim, meus
irmãos Darlan e Dayanne, meu sobrinho
Enzo e cunhada Gleylce.*

AGRADECIMENTOS

A lista de agradecimentos para mais essa conquista na minha vida é grande, mas não posso deixar de lembrar de quem contribuiu nessa etapa tão importante.

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem fé acredito que não chegamos a lugar nenhum. Somente a fé em Deus me fez suportar as inúmeras adversidades que encontrei ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Dalva e Joaquim, pelo dom da vida, pela educação que me foi concedida, pelo amor e admiração imensuráveis.

Aos meus irmãos Darlan e Dayanne, por nossa amizade, companheirismo, por rirmos e chorarmos juntos e a minha cunhada Gleylce, pessoa mais que especial e ainda me deu de presente um sobrinho lindo, o Enzo.

Ao meu marido Carlos e meu filho Carlos Diogo, por suportarem repetidas vezes minha ausência, meu mau humor, a falta de tempo para eles e mesmo assim, continuarem me amando, me apoiando e me dando muitas alegrias. Meu filho Diogo é a força que me move, o motivo que me faz enfrentar todas as dificuldades e buscar forças onde já não há mais.

Ao meu sogro Sr. Dedé e minha sogra Ana Maria, pelo carinho.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Luciana Gonçalves, pela pessoa brilhante que é, por me tranquilizar com seu otimismo, por transmitir seus conhecimentos e por todas as oportunidades que me deu. Meu eterno carinho, admiração e gratidão.

À Universidade de Granada (UGR - Espanha) e a todos os professores do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR), destacando Profa. Encarnación Jurado, Profa. Deisi Vaz e Prof. Miguel Román por me receberem e acolherem tão bem e por me propiciarem adquirir novos conhecimentos. Em especial à Profa. Deisi por todo apoio concedido, orientação, simpatia e simplicidade durante os 11 meses que trabalhamos e convivemos juntas.

Aos amigos que fiz na Universidade de Granada - Espanha, Raúl por sua companhia super agradável cheia de muita alegria, Rocio por me acolher logo que cheguei não me deixando ir comer sozinha, por suas conversas super engraçadas e sua alegria, Fran por sua simpatia e prestatividade, Otilia que iluminava o laboratório com sua elegância e pelas conversas nos momentos de descontração, Alejandro Burgos por sua ajuda com seus conhecimentos científicos, Pedro pela companhia, alegria e por se preocupar comigo quando ficava doente, José Luís (*in memoriam*), Paco Pacarros, e claro, Ignacio Moya, meu mais que companheiro de pesquisa que mais parecia um menino, por suas brincadeiras, por sua ajuda,

sua amizade, por me dar um rolo gigante de papel para enxugar minhas lágrimas nos momentos de desespero e logo me fazer rir chorando, por me fazer voltar a acreditar na humanidade. A Laura, esposa de Ignácio, por me acolher e por exalar tanta serenidade. A Danielle Maass, que conheci na UGR, que chegou no meu momento mais difícil na Espanha, tornando-se mais que uma companheira, mas uma amiga irmã. Obrigada por toda a ajuda, pelo carinho, amizade, por rirmos e chorarmos juntas, por conhecermos um pouquinho desse mundão em grande estilo, como mochileiras.

A Vanessa, amiga venezuelana, pelos bons momentos juntas e Alícia, minha verdadeira companheira de piso, por ser tão carinhosa e divertida.

Rosana e Cleiton, companheiros do doutorado sanduíche, em cidades vizinhas, pela alegria compartilhada em muitas viagens e pelo companheirismo durante os 11 meses que estivemos vivendo perto, superando nossos limites e ultrapassando barreiras. Rosana que antes era apenas conhecida tornou-se uma amiga muito querida, por sua alegria, companheirismo e exemplo de organização.

Diana e Ítalo, não só companheiros de pesquisa no Grupo GPBio, mas amigos de verdade. Meu muito obrigada pela nossa parceria e amizade.

Aos amigos que não são da vida acadêmica, Valesca, João Carlos, Amália, Carolina, Ana Mírian, Walésia, Tereza, Paulo de Tarso, Sandro, Goretti, Deusinete, Amélia e Fernanda pelo apoio com palavras de motivação sempre que precisei.

Ao Diogo Bezerra, sempre amigo e companheiro, Alaídes, amiga, irmã, confiante, por sempre estar ao meu lado para o que der e vier e Jouciane, uma amiga meiga e companheira, pelas palavras de conforto, por sua presença mesmo à distância, me apoiando, me consolando e não me deixando morar na tristeza.

Aos problemas vividos e superados, com os quais eu aprendi muito.

Aos companheiros de trabalho do Grupo GPBio, professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química (UFC).

Ao Departamento de Engenharia Química (UFC), Universidade Federal do Ceará (UFC) e Universidade de Granada (UGR - Espanha) por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de Doutora.

A CAPES pela bolsa de estudo fomentada e ao CNPq, pela oportunidade de fazer parte do Programa Ciências sem Fronteiras.

"Escolha o trabalho de que gostas e não terás de trabalhar um único dia em tua vida." (Confucio)

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
Resumen	3
Capítulo 1: Introdução	5
Capítulo 2: Objetivos	9
2.1. Objetivos Gerais.....	10
2.2. Objetivos Específicos	10
Capítulo 3: Revisão Bibliográfica	13
3.1. Biossurfactantes: Características, Propriedades e Aplicações	14
3.2. <i>Bacillus subtilis</i> e a Produção de Biossurfactantes.....	20
3.2.1. Linhagens de <i>Bacillus sp.</i> Isoladas de Solos de Manguezais do Ceará.....	22
3.3. Metodologias Utilizadas para Caracterização de Substâncias Desconhecidas.....	23
3.3.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	23
3.3.2. Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry, MS).....	24
3.4. Toxicidade e Biodegradabilidade e Tensoativos e Biotensoativos.....	24
3.4.1. Toxicidade de Tensoativos e Biotensoativos em Organismos Aquáticos	24
3.4.2. Biodegradabilidade de Tensoativos e Biotensoativos.....	30
Capítulo 4: Materiais e Métodos	32
4.1. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e Caracterização do Produto Obtido	33
4.1.1. Matérias-primas para Ensaio com Resíduo Agroindustrial	33
4.1.2. Microrganismos	33
4.1.3. Inóculo	34
4.1.4. Meios de Cultivo e Produção em Agitador Rotatório de Bancada	34
4.1.5. Concentração de Biomassa	35
4.1.6. Acompanhamento da Produção de Biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI00535	
4.1.6.1. Determinação da Tensão Superficial	35
4.1.6.2. Determinação do Índice de Emulsificação.....	36
4.1.7. Extração de Biossurfactantes.....	36
4.1.8. Determinação da Concentração de Surfactina.....	37
4.1.9. Determinação da Concentração de Substrato.....	38
4.1.10. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)	38
4.2. <i>Screening</i> de Cepas Produtoras de Biossurfactantes Isoladas de Solos de Manguezais do Estado do Ceará (Brasil).....	38

4.2.1. Microrganismos Testados	39
4.2.2. Inóculo	39
4.2.3. Meios de Cultivo e Produção em Agitador Rotatório de Bancada	40
4.2.4. Concentração de Biomassa	40
4.2.5. Acompanhamento da Produção de Biossurfactante por Cepas Produtoras de Biossurfactantes Isoladas de Solos de Manguezais do Estado do Ceará - Brasil.....	41
4.3. ICA56: Produção de Enzimas, Caracterização do Biossurfactante Produzido, Avaliação da Toxicidade e Biodegradabilidade	41
4.3.1. Tensão Superficial e Determinação da Concentração Micelar Crítica	41
4.3.2. Tensão Interfacial e Ângulo de Contato	42
4.3.3. Ensaio de Aplicação do Biossurfactante Produzido para a Remediação do em Solos Contaminados com Óleos Lubrificantes.....	42
4.3.4. Estabilidade da Emulsão	45
4.3.5. Índice de Emulsificação	45
4.3.6. Estabilidade do Biossurfactante Produzido Frente à Temperatura, pH e Concentração de NaCl.....	46
4.3.7. Ensaio de Biodegradabilidade.....	47
4.3.7.1. Ensaio de Biodegradabilidade Utilizando <i>Pseudomonas putida</i>	47
4.3.7.2. Ensaio de Biodegradabilidade: Método estático	49
4.3.8. Toxicidade em Organismos Marinhos	50
4.3.8.1. Toxicidade do Biossurfactante em Microalgas (<i>Selenastrum Capricornutum</i>)	51
4.3.8.2. Toxicidade do Biossurfactante ao Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	54
4.3.8.3. Toxicidade do Biossurfactante em Bactérias Marinhas Luminescentes <i>Vibrio fischeri</i> NRRL-B-11177	56
4.3.9. Inibição do Crescimento do Microrganismo Produtor de Biossurfactantes ICA56 em Placas Contendo Diferentes Contaminantes	60
4.3.10. Degradação de Contaminantes em Placa por ICA56	60
4.3.11. Produção de Enzimas.....	61
4.3.12. Caracterização do Biossurfactante Produzido por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	61
4.3.13. Espectrometria de Massa.....	62
Capítulo 5: Resultados e Discussões	63
5.1.1. Influência do pH	64
5.1.2. Avaliação da Adaptação da Cepa em Placas com Diferentes Meios	65
5.1.3. Influência da Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como Fonte de Nitrogênio.....	68
5.1.4. Uso de Nitrato de Amônio (NH_4NO_3) como Fonte de Nitrogênio	74
5.1.5. Influência da Temperatura	77

5.1.6. Caracterização em FTIR do Biossurfactante Produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005.....	80
5.1.7. Perda da Capacidade de Produção de Biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005	81
5.2. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por Linhagens Isoladas de Solos de Manguezais do Estado do Ceará: Jag248 e Jag249, isoladas do Rio Jaguaribe e ICA12, ICA24, e ICA56, isoladas de Icapuí.....	83
5.2.1. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus sp. Jag248</i>	83
5.2.2. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus sp. Jag249</i>	92
5.2.3. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por ICA12, ICA24 E ICA56	95
5.3. ICA56: Produção de Enzimas, Caracterização do Biossurfactante Produzido, Avaliação da Toxicidade e Biodegradabilidade.....	102
5.3.1. Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica	102
5.3.2. Tensão Interfacial e Ângulo de Contato	104
5.3.3. Ensaio de Aplicação do Biossurfactante Produzido por ICA56 para a Remediação em Solos Contaminados com Óleos Lubrificantes.....	106
5.3.4. Estabilidade da Emulsão Utilizando o Biossurfactante Produzido por ICA56 Medida em Lumicheck.....	107
5.3.5. Índice de Emulsão (Vórtex)	109
5.3.6. Estabilidade do Biossurfactante Produzido Frente à Temperatura, pH e Concentração de NaCl.....	110
5.3.7. Ensaio de Biodegradabilidade.....	114
5.3.7.1. Ensaio de Biodegradabilidade Utilizando <i>Pseudomonas putida</i>	114
5.3.7.2. Ensaio de Biodegradabilidade: Método Estático.....	116
5.3.8. Toxicidade em Organismos Marinhos	117
5.3.8.1. Toxicidade do Biossurfactante em Microalgas (<i>Selenastrum Capricornutum</i>)	117
5.3.8.2. Toxicidade do Biossurfactante ao Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	120
5.3.8.3. Toxicidade do Biossurfactante em Bactérias Marinhas Luminescentes <i>Vibrio fischeri</i> NRRL-B-11177	122
5.3.9. Inibição do Crescimento do Microrganismo Produtor de Biossurfactantes ICA56 em Placas Contendo Diferentes Contaminantes	124
5.3.10. Degradação em Placa.....	126
5.3.11. Produção de Enzimas.....	127
5.3.12. Caracterização do Biossurfactante Produzido por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	129
5.3.13. Espectrometria de Massa.....	130
Capítulo 6: Conclusões	134
Capítulo 7: Referências Bibliográficas.....	139

Resumo

Biossurfactantes são moléculas de origem microbiana que possuem ação superficial. Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina, os quais são produzidos mediante biotransformação de matérias-primas renováveis. Os biossurfactantes apresentam uma série de vantagens quando comparados aos surfactantes químicos convencionais, tais como: diversidade de estruturas químicas, excelentes propriedades superficiais e ecológicas, estabilidade frente a condições extremas (pH, temperatura, concentração de sais), entre outras. Dentro deste contexto, desenvolve-se o presente trabalho, cujo objetivo principal consiste em investigar a produção de biossurfactantes, em especial a surfactina, a partir da fermentação sumergida a partir de diferentes meios de cultivo (sintéticos e naturais) e microorganismos. Dentre os meios de cultivo testados, avaliou-se a utilização de fontes de carbono provenientes de resíduos do processamento do caju, um substrato não convencional, o suco de caju clarificado. A escolha do suco de caju clarificado justifica-se pelo fato de que a sua cadeia produtiva gera importantes volumes de co-produtos frequentemente desperdiçados na indústria. Diferentes linhagens de *Bacillus* foram testadas para a produção de biossurfactantes, destacando-se a linhagem denominada ICA56, isolada do solo de manguezal de Icapuí. O biotensioativo produzido pelo microrganismo ICA56 foi caracterizado em quanto a sua atividade superficial, capacidade emulsionante e estrutura química. As propriedades ecológicas do bioproduto foram avaliadas mediante testes de toxicidade e biodegradabilidade. Ensaio de remediação de solos contaminados com óleo de motor foram também desenvolvidos com a finalidade de estudar o potencial do biossurfactante em áreas ambientais. Como principais resultados, destacam-se os valores de tensão superficial ($28,20 \pm 0,07$ mN/m), tensão interfacial ($5,26 \pm 0,08$ mN/m a 65°C , para uma concentração de 60 mg/L), e concentração micelar crítica, cujos valores estão de acordo com os trabalhos publicados por outros pesquisadores. Mediante análises de FTIR e MS, o biossurfactante foi identificado como surfactina. Em quanto aos ensaios de toxicidade, o biossurfactante apresentou ser de baixa toxicidade em diferentes organismos marinhos, como microalgas (*Selenastrum capricornutum*), microcrustáceos (*Daphnia magna*) e a bactéria *Vibrio fischeri*, apresentando valores de EC_{50} de 65,03 mg/L, 170,09 mg/L e 912,35 mg/L, respectivamente. Adicionalmente, o biossurfactante produzido por ICA56 apresentou uma alta biodegradabilidade, sendo degradado por bactérias presentes em águas de efluentes residuais e por *Pseudomonas putida*. Em testes qualitativos, visualizou-se eficiente degradação de petróleo e mesclas de óleo de girassol e oliva (tanto virgem como usado) pelo microrganismo ICA56, bem como capacidade de produção de enzimas do tipo amilases e proteases.

Palavras-chave: Linhagens de *Bacillus sp.*; produção de biossurfactantes; surfactina, remediação, biodegradabilidade; toxicidade.

Abstract

Biosurfactants are surface active substances produced by microorganisms and plants. Compared to conventional chemical surfactants, biosurfactants present a lower environmental impact and higher performance for certain applications. Lipopeptides, which are produced by bacteria of the genus *Bacillus*, are a particularly effective group of biosurfactants, surfactin being the most representative of them. The aim of the present study is to investigate the production of a lipopeptide biosurfactant by different microbial strains, all of them of the genus *Bacillus*, in different culture media (synthetic and natural) and always in submerged fermentation. Wastes from the cashewnut and fruit processing process, particularly those generated by the production of clarified cashew-apple juice, were used as carbon sources. The choice of clarified cashew-apple juice is justified because its production generates great volumes of co-products, which are often unexploited by industry. The biosurfactant produced was later characterized by measuring their interfacial and environmental properties, such as the remediation efficiency of a soil contaminated with motor-oil. Results showed that the strains tested were able to produce biosurfactants, remarkably the strain called ICA56, which was isolated from soil of the Icapui Mangrove (Ceará, Brasil). The biosurfactant produced by the ICA56 strain was identified as surfactin, and exhibited a significant reduction capacity of surface and interfacial tension, which attained values of 28.20 ± 0.07 mN/m (ST) and $05,26 \pm 0,08$ mN/m (IT - 3xCMC - 65°C) in its presence. The Critical Micelle Concentration (CMC) was also determined, the results being in good agreement with those in literature. The biosurfactant produced by ICA56 also showed low toxicity to different aquatic organisms (the values of EC50 found with *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia magna*, and *Vibrio fischeri* , were 65.03 mg/L, 170.09 mg/L and 912.35 mg/L, respectively). As expected the biosurfactant from ICA56 was also completely biodegraded by bacterial populations in wastewaters as well as by *Pseudomonas putida*. In qualitative tests, the strain ICA56 was also able to degrade blends of sunflower and olive oil, and to produce enzymes such as amylases and proteases.

Keywords: Strains of *Bacillus sp.*; production of biosurfactants; surfactin, soil washing, biodegradability; toxicity.

Resumen

Los biosurfactantes son sustancias de origen microbiano que poseen actividad superficial. Un grupo de biosurfactantes especialmente eficaces son los lipopéptidos, entre los que destaca la surfactina, que son producidos por bacterias del género *Bacillus* mediante la transformación de sustratos renovables. Dichos tensioactivos presentan un gran número de ventajas cuando se los compara con los tensioactivos sintéticos tradicionales.

En el presente estudio se investigó la producción de biosurfactantes, y en particular la de surfactina, mediante procesos fermentativos con diferentes cepas de *Bacillus*. Para ello se utilizaron medios de cultivo de diferente procedencia (naturales y sintéticos), habiéndose dado especial atención al empleo de fuentes de carbono residuales, como son los residuos del procesado del anacardo, y en concreto de la producción de zumo del fruto del anacardo clarificado (“cajuína”). El uso de fuentes de carbono no convencionales se justifica debido a la necesidad de reducir los costos de producción de los biosurfactantes, ya que en la actualidad la producción a gran escala de biosurfactantes resulta todavía poco atractiva económicamente. Por otra parte, el uso de subproductos de la industria del anacardo resulta una alternativa muy interesante, ya que en Brasil, y concretamente en el estado de Ceará, se generan elevados volúmenes de estos subproductos. Además los biosurfactantes producidos fueron posteriormente estudiados desde el punto de vista estructural y de sus propiedades interfaciales.

Tal y como se ha indicado, en las fermentaciones se emplearon diferentes cepas de *Bacillus* (todas ellas aisladas en Brasil), de las cuales se destaca la cepa denominada ICA56, aislada de suelo de manglar (Manglar de Icapuí, Brasil). Desde este punto de vista el trabajo se desarrolló en tres etapas:

1. Etapal. Se estudió la producción y caracterización de biosurfactantes con una cepa aislada de la Estación de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) del Campus de Pici, en la Universidad Federal de Ceará (Brasil), denominada *Bacillus subtilis* LAMI005.
2. Etapal 2. En esta segunda etapa, se trabajó con cepas de *Bacillus sp* aisladas de manglares de los ríos Jaguaribe e Icapuí, denominadas Jag248, Jag249, ICA12, ICA 24 e ICA56.
3. Etapal 3. En ella se desarrollaron estudios exhaustivos con la cepa denominada ICA56, en los que el biosurfactante producido ha sido caracterizado en cuanto a sus propiedades interfaciales (tensión superficial, tensión interfacial, concentración micelar crítica o CMC, y ángulo de contacto), capacidad emulsionante y estructura química. Asimismo, también se estudió la compatibilidad ambiental del producto mediante ensayos de biodegradabilidad y toxicidad. Finalmente se desarrollaron ensayos de remediación de suelos contaminados con aceite lubricante con la finalidad de evaluar el potencial de uso del biosurfactante en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Cómo principales resultados de la Etapal, se destaca que, en las condiciones experimentales adoptadas, el microorganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 fue capaz de producir biosurfactante, llegando a alcanzar valores de concentración de 225 mg/L (pH 6.0) y 275 mg /L (pH 7.0) en el medio de cultivo. Bajo todas las condiciones estudiadas, la

producción de biosurfactante vino acompañada de una reducción de la tensión superficial del medio líquido hasta valores de $28,3 \pm 0,3$ mN/m. Además, el microorganismo demostró poseer capacidad para emulsionar diversos hidrocarburos (aceite de soja, queroseno y n-hexadecano) con un valor de índice de emulsificación (IE24) superior al 60%. Los análisis estructurales realizados, en concreto los espectros vibracionales obtenidos en la región del infrarrojo (FTIR), confirman que el biosurfactante producido pertenece a la clase de los lipopéptidos.

En la Etapa 2, se verificó que el microorganismo denominado *Bacillus sp.* Jag248 presenta una clara producción de surfactina, alcanzando valores de concentración de hasta 161.41 ± 0.01 mg/L en medio mineral; dicha producción fue acompañada de una reducción de la tensión superficial hasta los 28.50 mN/m. El biosurfactante producido fue capaz de emulsionar aceite de soja, n-hexadecano y queroseno, presentando valores de IE24 de 50%. En lo que se refiere al *Bacillus sp.* Jag249, se ha verificado que, en las condiciones experimentales adoptadas, no fue capaz de producir biosurfactantes. En cuanto a las cepas ICA12, ICA24 e ICA56, se llegó a la conclusión de que las mismas son capaces de producir biosurfactantes, y por lo tanto, reducir significativamente la tensión superficial de los medios de cultivo (valores finales de aproximadamente 28.25 ± 0.4 mN/m). Entre las cepas estudiadas, la que permitió alcanzar una mayor concentración de biosurfactante en un medio mineral adicionado de solución de micronutrientes e inóculo *LB Broth* fue la ICA56 (329.14 ± 0.00 mg/L) seguida de la cepa ICA12 (253.32 ± 2.04 mg/L, en medio mineral adicionado de solución de micronutrientes) y de la ICA24 (111.87 ± 0.00 mg/L, medio adicionado con jugo de anacardo clarificado).

Las propiedades interfaciales determinadas en la Etapa 3, tensión superficial (28.20 ± 0.07 mN/m), tensión interfacial (5.26 ± 0.08 mN/m a 65°C , para una concentración de 60 mg/L), y CMC, están de acuerdo con la literatura. Adicionalmente, se verificó que los valores de tensión superficial y tensión interfacial disminuyen con el aumento de temperatura (intervalo $25 - 65^\circ\text{C}$). Mediante análisis de Espectroscopía Infrarroja (FTIR) y Espectrometría de Masas (MS) se identificó al biosurfactante producido por ICA56 como surfactina. Se investigó también la producción simultánea de biosurfactantes y enzimas por el microorganismo ICA56, constatándose la presencia de amilasas y proteasas en el medio de fermentación al final del proceso. En lo que se refiere a los ensayos de toxicidad, el biosurfactante presentó una baja toxicidad para diferentes organismos, cómo son las microalgas (*Selenastrum capricornutum*), microcrustáceos (*Daphnia magna*) y la bacteria *Vibrio fischeri*, presentando valores de EC50 de 65.03 mg/L, 170.09 mg/L y 912.35 mg/L, respectivamente. El biosurfactante producido por ICA56 presentó también una alta biodegradabilidad, siendo degradado tanto por bacterias presentes en aguas residuales urbanas (población mixta y aireada) cómo por *Pseudomonas putida*.

Por último los ensayos de lavado de suelos contaminados con aceites lubricantes permitieron estudiar el efecto de la temperatura y de la concentración del biosurfactante producido por ICA56 sobre la eficacia de lavado. Mediante técnicas estadísticas, se comprobó la significancia de ambos parámetros. Los mejores resultados de lavado (85% de eficacia) se obtuvieron a 65°C , para una concentración de biosurfactante de 60 mg/L. En ensayos cualitativos también se verificó que el microorganismo ICA56 es capaz de degradar de forma eficiente petróleo y mezclas de aceite de girasol e oliva (tanto virgen como usado), lo que sugiere la posibilidad de su uso para fines de biorremediación.

Palabras clave: *Bacillus sp.*; producción de biosurfactantes; surfactina, remediación de suelos, biodegradabilidad; toxicidad.

Capítulo 1: Introdução

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção polar solúvel em água, pode ser iônica, não iônica ou anfotérica, ou seja, exibir características aniônicas ou catiônicas dependendo das condições de pH da solução aquosa na qual estão inseridos e outra apolar que é geralmente um hidrocarboneto, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios (DESAI & BANAT, 1997). Constituem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais, tendo como características importantes a fácil biodegradabilidade, baixa toxicidade e, conseqüentemente, fácil aceitabilidade ecológica por atuarem como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos, apresentando baixa solubilidade em água, capacidade de atuar em condições drásticas de temperatura ou pH (DESAI & BANAT, 1997, COOPER *et al.*, 1981; MULLIGAN, 2005; YEH *et al.*, 2006).

Os biossurfactantes são produzidos por biotransformação de matérias-primas renováveis, podendo ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Apresentam grande diferença em relação aos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica, além da vantagem de baixos impactos ambientais em relação aos detergentes químicos convencionais (SHAFI & KHANNA, 1995; BANAT *et al.*, 2000). O potencial de aplicação dos biossurfactantes, produzidos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em diversos campos da agricultura, da construção, de indústrias alimentícias, de bebidas, petróleo, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (BOGNOLO, 1999; FIECHTER, 1992; MULLIGAN *et al.*, 2001). Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (DESAI & BANAT, 1997).

Os surfactantes têm a capacidade de reduzir a tensão interfacial e de promover a formação de emulsões (Fernandes *et al.*, 2008), encontrando também papel fundamental na estabilidade de ditas emulsões, já que impede os fenômenos de floculação e coalescência (SHAHIDZADEH *et al.*, 2000, LIMA, 2004). O processo de emulsificação é acompanhado por um aumento da área interfacial, o que produz uma elevação brusca da energia livre de superfície (BECHER, 1965).

Apesar das características mencionadas dos surfactantes naturais, a sua produção em grande escala ainda não é economicamente competitiva, devido especialmente aos custos associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e a utilização de substratos caros (FOX & BALA, 2000). Sendo assim, com a finalidade de reduzir os custos de produção, alguns pesquisadores sugerem o uso de matérias-primas de baixo custo, tais como os resíduos agroindustriais (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; MERCADE; MANRESA, 1993; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

Basado nesse contexto, e ainda, avaliando o âmbito regional, mais especificamente da agroindústria do estado do Ceará, o suco de caju é um potencial substrato a ser estudado, uma vez que é uma matéria-prima rica em carboidratos, fibras, vitaminas e sais minerais de grande abundância na região Nordeste (ROCHA *et al.*, 2006). O suco contém ainda diversos aminoácidos, proteínas e sais minerais como ferro (Wei & SHU, 1998; WEI *et al.*, 2004) e manganês (WEI & SHU, 2002), considerados importantes para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, tornando-se por tanto uma excelente alternativa.

No Brasil estima-se que a área ocupada com cajueiro corresponde a aproximadamente 723.928 ha, com produção média de 737.859.346 t. A região Nordeste respondeu no ano de 2013, com cerca de 100% da área colhida e da produção nacional, onde os estados do Ceará produziu 58,8%, Piauí 19,2% e Rio Grande do Norte com 15,2%, responsáveis por cerca de 93,2% da área cultivada no país de acordo com dados divulgados pelo IBGE para safra de castanha de caju de 2013 (Safra de caju, IBGE, 2013). Calcula-se que seja utilizado apenas de 15% a 20% da polpa na fabricação de doces, sucos, vinho ou consumo *in natura* e que 80% seja desperdiçado. Ainda há grande perda do pseudofruto no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento da castanha, no entanto, ressalta-se que o pseudofruto não interessa a maioria das empresas (Garruti *et al.*, 2003), exceto as produtoras de suco.

MULLIGAN *et al.* (1993) afirma que diferentemente dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente biodegradáveis na água e no solo, tornando-os assim, adequados para aplicações em biorremediação e tratamento de resíduos. Grande atenção também têm sido voltada aos biossurfactantes devido a crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, geralmente a base de petróleo (Cameotra e Makkar, 1998), bem como por apresentarem baixa toxicidade, permitindo assim o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ *et al.*, 1998).

Toda essa questão em torno das propriedades ecológicas (toxicidade e biodegradabilidade) dos biossurfactantes ocupam um papel de destaque na literatura, no entanto, ainda encontra-se pouco estudada. Com o intuito de explorar mais esse campo, investiu-se especialmente por essa linha de pesquisa, investigando a toxicidade e biodegradabilidade do biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus sp.* oriundas de solos de manguezais do Ceará- Brasil.

Em síntese, no presente estudo produziram-se biossurfactantes a partir de linhagens de *Bacillus sp.* utilizando diferentes meios de cultivo, padrão analítico e resíduos, realizando-se testes de caracterização das propriedades interfaciais (tensão superficial, tensão interfacial e CMC), assim como as propriedades ecológicas (biodegradabilidade e toxicidade), assim como testes de descontaminação de solos. Também avaliou-se a estabilidade do biossurfactante produzido frente a diferentes condições de pH, temperatura e concentração de sal (NaCl). Ditos testes foram realizados visando determinar as principais características e o potencial de aplicação do biossurfactante produzido.

Capítulo 2: Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho objetivou encontrar as melhores condições de produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus sp.* em cultivo submerso utilizando diversas fontes de carbono: (a) suco de caju clarificado (resíduo agroindustrial) e (b) meios padrão analítico (P.A), utilizando como fonte de carbono a glicose, e uma mescla de glicose e frutose. Realizaram-se testes de caracterização das propriedades interfaciais e ecológicas do bioproduto obtido, assim como aplicações comerciais usuais.

2.2. Objetivos Específicos

O trabalho desenvolveu-se em três etapas. Inicialmente trabalhou-se com uma cepa isolada de uma estação de tratamento de esgoto do campus do Pici (Universidade Federal do Ceará - UFC), *Bacillus subtilis* LAMI005 e posteriormente, na segunda etapa, com cepas isoladas dos mangues do Rio Jaguaribe e Icapuí (Jag248, Jag249, ICA12, ICA 24 e ICA56). Após o *screening* das cepas, selecionou-se a cepa denominada ICA56 para o desenvolvimento da fase final deste trabalho, na qual realizaram-se diferentes testes para caracterizar as propriedades ecológicas e interfaciais do biossurfactante produzido, assim como testes de avaliação possíveis aplicações.

Os objetivos específicos referentes a cada uma destas etapas deste trabalho são os seguintes:

1ª Etapa:

- Avaliar a adaptação da cepa (*Bacillus subtilis* LAMI005) em placas empregando os seguintes meios: APGE (Ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) e Agar com suco de caju clarificado;
- Estudar a influência do pH, temperatura (28°C, 30°C e 32°C) e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 – 1,0 e 2,0 g/L);
- Avaliar a influência de diferentes tipos de fonte de nitrogênio (nitrato de amônio

- NH_4NO_3) e sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Realizar a caracterização estrutural do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 mediante FTIR.

2ª Etapa:

- Avaliar a produção de biossurfactantes usando cepas promissoras isoladas de solos de manguezais do estado do Ceará: cepas Jag248 e Jag249, isoladas do Rio Jaguaribe, e cepas ICA12, ICA24 e ICA56, isoladas de Icapuí/Brasil.

3ª Etapa:

- Determinar os valores de concentração micelar crítica do biossurfactante produzido a diferentes temperaturas (25, 45 e 65°C);
- Determinar os valores de tensão interfacial (solução de biossurfactante frente a dodecano) a 25, 45 e 65°C (Concentrações de BS: $\frac{1}{2}$ CMC, CMC y 3 x CMC);
- Determinar o ângulo de contato entre soluções de diferentes concentrações de biossurfactante (20, 40 e 60mg/L) e Parafilm® a 25°C;
- Avaliar a estabilidade do bioproduto frente a temperatura (25,45 e 65°C), pH (2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12) e concentrações de NaCl (10, 20, 30, 40 e 50 mg/L);
- Estudar da estabilidade de emulsões formadas por soluções de biossurfactante (concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 g/L) e dodecano mediante medidas de retroespalhamento durante 24 horas a 25°C (LUMiCheck ®, a partir de LUM, Alemanha);
- Determinar os valores de Índice de emulsão a 25°C, assim como a estabilidade das emulsões formadas durante 14 dias usando concentrações de BS de 0,1, 0,5 e 1,0 g/L;
- Realizar a caracterização estrutural do BS mediante técnicas de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Massa (SM);
- Avaliar a biodegradabilidade do biotensoativo utilizando os métodos de degradação por *Pseudomonas putida* (durante 72 horas) e de população mista e aerada proveniente de uma depuradora da cidade de Granada – Espanha (durante 28 dias);
- Avaliar a toxicidade do BS frente a diferentes organismos: microalgas

Selenastrum Capricornutum, microcrustáceo *Daphnia magna* e com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*;

- Avaliar o potencial de aplicação do BS para o lavado de solos contaminados com óleo de motor realizando ensaios a diferentes temperaturas (25, 45 e 65°C) e concentrações de biossurfactante (1/2 da CMC, CMC e 3 x CMC);
- Verificar a existência de inibição de crescimento em placa APGE repicada com ICA56 por ação de diferentes contaminantes: petróleo em diferentes concentrações, óleo de motor virgem e usado, mescla óleo de girassol/oliva (80:20 p/p) virgem e usado;
- Avaliar a degradação de contaminantes impregnados em areia utilizando inóculo de ICA56 em placa petri: Petróleo em diferentes concentrações, óleo de motor virgem e usado, mescla óleo de girassol/oliva (80:20) virgem e usado;
- Avaliar qualitativamente a produção de enzimas (proteases, amilases e lipases) ao final do processo de produção de BS.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

3.1. Biossurfactantes: Características, Propriedades e Aplicações

Biossurfactantes são compostos ativos de superfície produzidos por microrganismos. Existem relatos de diversos tipos de biossurfactantes produzidos por diversos gêneros de bactérias com base em sua natureza química, tais como glicolipídeos, lipopolissacarídeos, oligossacarídeos, e lipopeptídeos (BANAT *et al.*, 2000, BANAT *et al.*, 2010; FRANZETTI *et al.*, 2010). Estas estruturas conferem uma grande variedade de propriedades, incluindo a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos e formar micelas e microemulsões entre duas fases distintas (BANAT *et al.*, 2010).

Biossurfactantes recebem atenção considerável na reparação dos danos ambientais, tais como processos de biorremediação, lavagem do solo, dentre outros (THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT IBRAHIM M., 2010). Os mesmos influenciam nestes processos devido sua eficácia como agentes de dispersão e remediação, bem como por suas características ecológicas, como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (MULLIGAN, 2005; DAS; MUKHERJEE, 2009; SIVAPATHASEKARAN *et al.*, 2010; KIRAN *et al.*, 2010; SATPUTE *et al.*, 2010).

O segundo maior grupo de biossurfactantes de origem microbiana é representado pelos lipopeptídeos que são sintetizados por uma ampla gama de gêneros de microrganismos, incluindo *Pseudomonas* e *Bacillus*. Devido à sua excepcional capacidade de interagir com a membrana celular, os lipopeptídeos são bem conhecidos como antimicrobianos, embora na presença de compostos hidrofóbicos possam vir a agir como poderosos surfactantes exibindo uma ampla gama de atividades. Lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* em particular, são os mais conhecidos (PERFUMO *et al.*, 2010).

Bacillus degradam de hidrocarbonetos e produzem lipopeptídeos secretando para o meio biossurfactantes, se reúnem para formar micelas que atuam para solubilizar e emulsionar o substrato. Como agentes de superfície, estes biossurfactantes são excelentes espumantes e em geral muito ativos no nível da interface, devido às baixíssimas tensões interfaciais (IFT) de 0,01 mN/m, que os mesmos são capazes de gerar. Além disso, esses lipopeptídeos podem modular a hidrofobicidade bacteriana (PERFUMO *et al.*, 2010).

A aplicação de biossurfactantes na remediação de compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos, visa aumentar a sua biodisponibilidade ou mobilização e remoção dos contaminantes por pseudosolubilização e emulsificação através de um tratamento de lavagem (BANAT *et al.*, 2010).

Os países industrializados vêm buscando alternativas aos surfactantes sintéticos derivados do petróleo por tensoativos provenientes de fontes renováveis. O desenvolvimento de bioprodutos compatíveis com o meio ambiente tem recebido maior atenção nos últimos anos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A possibilidade de aplicação dos biossurfactantes em diferentes setores industriais tais como alimentos, cosméticos, agricultura detergentes e área médica justifica sua produção. No entanto, a indústria do petróleo recebe maior destaque, aumentando do interesse pela produção, incorporação nas formulações de óleos, uso na dispersão de derramamento de óleo no mar e em solos, emprego na remoção de lodo e óleo de tanques de estocagem, na descontaminação ambiental, em remediação, na recuperação melhorada do petróleo, dentre outras aplicações (FIECHTER, 1992; PIRÔLLO, 2006; BOGNOLO, 1999; KIM *et al.*, 2010).

Vantagens relacionadas à baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, variedade de estruturas químicas, estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e concentrações de sal, despertam o interesse por sua produção (FARIA, 2010; ABDEL-MAWGROUND *et al.*, 2010).

Uma das principais características de um surfactante é a sua habilidade para diminuir a tensão superficial (TS). O surfactante interage com a molécula de água, diminuindo o trabalho requerido para aumentar à superfície. A concentração micelar crítica (CMC), menor concentração de surfactante na água onde ocorre a formação de micelas, é outro parâmetro frequentemente estudado e utilizado para determinar a eficácia de um surfactante. Após atingir a CMC, mesmo com o aumento da concentração de surfactante na solução, a TS permanece constante. Fatores como pH, temperatura e força iônica influenciam diretamente na CMC (OBERBREMER *et al.*, 1990; SAMSON *et al.*, 1990).

Segundo Rosenberg & Ron (1999), existem biossurfactantes de baixo e alto peso molecular. Enquanto os biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos, os biossurfactantes de alto peso molecular apresentam maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água.

Em síntese, os biossurfactantes são capazes de emulsificar diversos hidrocarbonetos, aumentando sua solubilidade em água, diminuindo a tensão interfacial e ainda favorecendo o deslocamento das substâncias oleosas agregadas às partículas do solo, por exemplo (Banat, 2000; Lima, 2007).

Em comum com todas as moléculas que atuam em superfícies, os biossurfactantes contêm um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos. Os grupamentos lipofílicos podem ser

uma proteína ou um peptídeo, apresentando partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos. Já os grupos hidrofílicos são ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos (BOGNOLO, 1999; MORIKAWA *et al.*, 1993 apoud COLLA & COSTA, 2003).

A Tabela 1, apresenta os tipos de biossurfactantes e seus respectivos microrganismos produtores.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

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

Fonte: Desai & Banat, 1999; Nitschke e Pastore, 2002.

As características apresentadas pelos biossurfactantes, em especial vantagens em relação aos surfactantes convencionais sintéticos, tem despertado o interesse pela busca do seu uso (NITSCHKE *et al.*, 2007). A literatura apresenta dados de atividade superficial e interfacial mostrando que os biossurfactantes são bem mais efetivos que os surfactantes sintéticos, como os detergentes aniônicos sulfatados, por produzirem menor tensão superficial

em menores concentrações de biossurfactante (BOGNOLO, 1999; COOPER & PADDOCK 1984). A medida de eficiência de um biossurfactante é a sua concentração micelar crítica (CMC), que varia entre 1,0 e 2000 mg/L e a tensão interfacial em fases óleo/água e superficial fica em torno de 1,0 e 30 mN/m respectivamente, de acordo com estudos realizados sobre esses biotensioativos (BOGNOLO, 1999). Quanto menor a CMC mais eficiente é considerado o biossurfactante (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011), e mais eficaz, levando em consideração especialmente o ponto de vista econômico para aplicações industriais. A Figura 1 mostra um esquema ilustrativo que representa a acumulação de biossurfactantes na interface entre líquido e ar.

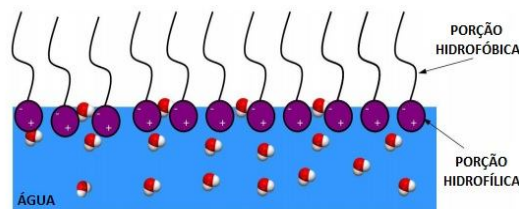


Figura 1 - Esquema representativo da acumulação de biossurfactants na interface entre líquido e ar. (Fonte: PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011).

Biossurfactantes com grande atividade podem diminuir a tensão superficial da água de 72 a 30 mN/m e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano, por exemplo, de 40 a 1 mN/m (DESAI & BANAT, 1997; SOBERÓN-CHÁVEZ & MAIER, 2011). A atividade dos biotensioativos dependem da concentração dos compostos activos de superfície até que a concentração micelar crítica (CMC) seja obtida. Em concentrações acima da CMC, as moléculas de biossurfactante associam-se para formar micelas, bicamadas e vesículas, como pode ser observado na Figura 2.

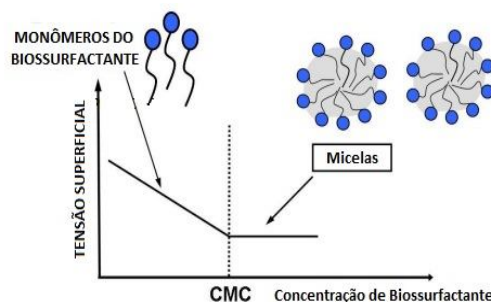


Figura 2 - Relação entre concentração de biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas. (Fonte: WHANG *et al.*, 2008).

Segundo Whang *et al.* (2008), a formação de micelas pelos biosurfactantes permite reduzir a tensão superficial e interfacial onde os mesmos estiverem presentes e aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos. Já a formação das microemulsões não tem relação significativa com a CMC (NGUYEN *et al.*, 2008). As microemulsões são misturas líquidas claras e estáveis de domínios de água e óleo separados por monocamada ou agregados de biosurfactantes e formam-se quando uma fase líquida é dispersa como gotículas em outra fase líquida, por exemplo, óleo disperso em água denominada uma microemulsão direta, ou água dispersa em óleo, uma microemulsão invertida (DESAI & BANAT, 1997).

Outra característica bastante relevante dos biosurfactantes é sua elevada tolerância à temperatura, pH e força iônica, podendo ser utilizados em condições drásticas para esses parâmetros. *Bacillus licheniformis* JF-2 excreta um biosurfactante do tipo lipopeptídeo, estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas e pH entre 5,0 e 12,0 (HOROWITZ *et al.*, 1990). A maioria dos biosurfactantes suportam concentrações em torno de 10% de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2 a 3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais.

Dentre diversas aplicações dos biosurfactantes (Tabela 2), destacam-se ainda o uso na área médica, podendo ser citada a surfactina entre os tensoativos mais conhecidos, que possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, a formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral, dentre outros (PEYPOUX *et al.*, 1999). A surfactina lipopéptido cíclico, produzida por linhagens de *Bacillus sp.*, é composta por uma estrutura de anel de sete aminoácidos ligado a uma cadeia de ácido graxo por meio de ligação de lactona, possuindo capacidade de reduzir a tensão superficial 72-27,9 mN/m, em concentrações tão baixas quanto 0,005%. A iturina, lipopeptídeo, um dos surfactantes também excretados por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (THIMON *et al.*, 1995). Valraeds-Martine *et al.* (1996) ao verificarem a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biosurfactante produzido por *Lactobacillus*, sugeriram o desenvolvimento de agentes anti-adesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes.

Em aplicações na agricultura, os biosurfactantes são muito usados na hidrofilização de solos argilosos, para obter boa umidade e auxiliar na distribuição uniforme de fertilizantes (NITSCHKE *et al.*, 2007). A literatura também reporta a utilização de

bioemulsificantes na formulação de herbicidas e pesticidas, pois os compostos ativos dessas formulações são, geralmente hidrofóbicos, necessitando a adição de agentes emulsificantes para dispersá-los em meio aquoso (ROSENBERG; RON, 1999).

Tabela 2 - Funções dos biossurfactantes e suas aplicações.

Função do Biossurfactante	Aplicações
Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química em geral
Solubilização	Alimentícia, cosmética, farmacêutica, papel, plásticos e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, petrolífera, plásticos, curtumes, biorremediação e têxtil
Detergente e formadores de espuma	Curtumes, produtos para agricultura, indústria química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizadores	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de Resíduos
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia e cascalho	Construção civil

Fonte: SINGH *et al.*, 2007; NITSCHKE & PASTORE, 2002; KOSARIC *et al.*, 1987.

Apesar das inúmeras vantagens relatadas em literatura aplicações potenciais para os biossurfactantes, a sua aplicação em larga escala é ainda bastante limitada, devido a diversos fatores, destacando-se dentre eles o seu alto custo de produção. A área de aplicação ambiental, é a que está mais desenvolvida, uma vez que os biossurfactantes aceleram a degradação microbiana de vários óleos, devido a sua capacidade de aumentar a interação interfacial água-óleo e, assim, promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995; BUGAY, 2009). Em relação ao uso ligado a indústria petrolífera, os biossurfactantes podem ser aplicados em recuperação avançada de petróleo melhorando a drenagem de óleo em poço, estimulando a liberação de óleo aprisionado por capilares, no molhamento de superfícies sólidas, ajudam reduzir a viscosidade do óleo e petróleo ao ponto de fluidez, reduz a tensão

interfacial, dissolvendo o petróleo, dentre diversas outras funções. Os biossurfactantes atuam ainda na como de-emulsificantes de emulsões de óleo, solubilizantes de óleo, redutores da viscosidade e como agente molhante (SINGH *et al.*, 2007). Silva & Kiperstok (2000), define preventores de emulsão ou desemulsificantes como produtos químicos que, dependendo da sua afinidade, desemulsificam e desestabilizam as emulsões de água em óleo ou de óleo em água. Nas emulsões de água em óleo, os desemulsificantes agem na superfície das gotículas de água, de modo que estas se rompam. Nas emulsões de óleo em água, os aditivos devem ser solúveis na água e agir na superfície das gotículas do óleo emulsionado, fazendo com que se coagulem e se separem da água.

3.2. *Bacillus subtilis* e a Produção de Biossurfactantes

O uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial tem sido uma alternativa para a produção de biossurfactantes em escala comercial. O aproveitamento de resíduos industriais e agroindustriais vem sendo incentivado por contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como por permitir a valorização dos resíduos que seriam descartados (LIMA, 2008). Os processos de produção requerem ainda métodos eficientes de recuperação do composto produzido, no entanto, diferentes métodos têm sido usados nos processos de extração, podendo ser citados a ultracentrifugação (MUKHERJEE *et al.*, 2006), a ultrafiltração (SEN & SWAMINATHAN, 2005), a precipitação com ácido ou sal (SEN & SWAMINATHAN, 2004) e a extração por solvente e adsorção por cromatografia (DUBEY, 2005). devido ao fato do curto tempo de geração dos microrganismos, comparativamente ao crescimento de animais, plantas e outros, a produção de biossurfactantes por via microbiológica é considerada como a forma mais promissora de se produzir esses compostos (LANG, 2002).

Vários estudos vem sendo realizados sobre a otimização dos meios líquidos para fermentação submersa (FS) e condições de cultura para obtenção biossurfactantes produzidos por cepas do gênero *Bacillus*. Para acompanhamento da produção de biossurfactantes no meio de cultura, quando realizado em fermentação submersa, é geralmente seguida qualitativamente pela determinação da tensão superficial (TS) do sobrenadante do cultivo livre de células e quantitativamente por técnicas cromatográficas como a CLAE para a análise de lipopeptídeos (SANTOS, 2001).

Cepas de *Bacillus* têm sido indicadas pela produção do biossurfactante denominado surfactina, o qual consiste de um lipopeptídeo cíclico consistindo de um ácido graxo de 14 a 15 carbonos ligado a um peptídeo com 7 resíduos de aminoácidos (COLLA & COSTA, 2003). Fox e Bala (2000) utilizando um meio rico em amido, simulando os resíduos de indústrias de processamento de batatas obtiveram elevados rendimentos de produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*. Os resultados demonstraram que o microrganismo foi capaz de degradar substratos para a produção do biossurfactante, apresentando redução na tensão superficial de $71,3 \pm 0,1$ para $28,3 \pm 0,3$ mN/m no meio formulado, e redução para $27,5 \pm 0,3$ mN/m em um meio contendo amido comercial e sais minerais. Kim *et al.* (1997) ao avaliar a produção de um biossurfactante por *Bacillus subtilis* C9 utilizando como fontes de carbono a glicose, óleo de soja ou n-hexadecano, obteve elevado rendimento de produção com glicose como fonte de carbono, enquanto a utilização de hidrocarbonetos como substrato inibiu a produção do biossurfactante. A produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.* provavelmente ocorre devido a mecanismos de proteção da célula ao ataque de outros microrganismos (COLLA & COSTA, 2003). A surfactina é considerada como um CLPBS (cyclic lipopeptide biosurfactants) e possui diversas atividades biológicas, podendo destacar sua função antibacteriana e antiviral e ainda seu potencial na estimulação da atividade dos macrófagos (VOLLENBROICH *et al.*, 1997).

Al-Ajlani *et al.* (2007) ao avaliarem a produção de surfactina de *Bacillus subtilis* MZ-7 cultivadas em meio comercial obtiveram um rendimento de 300 mg/L utilizando sacarose como fonte de carbono e adicionando ferro ao meio de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, o microrganismo ICA56 chegou a produzir $329,14 \pm 0,00$ mg/L em meio mineral adicionado de solução de micronutrientes proposto por Mórán *et al.* (2000). WEI *et al.* (2007) ao realizarem estudo usando métodos de desenho experimental Taguchi para otimizar a composição do elemento de traço para uma maior produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, avaliou a influência de elementos-traço para produção da surfactina obtendo um rendimento de 3,34 g/L com a adição de 40 mmol/L de Mg^{+2} e 10 mmol/L de K^{+} .

3.2.1. Linhagens de *Bacillus sp.* Isoladas de Solos de Manguezais do Ceará

Microorganismos produtores de biossurfactantes têm sido isolados de vários ambientes, como solo, água do mar, sedimentos marinhos, estações depuradoras de tratamento de águas residuais, entre outros. Bodour *et al.* (2003) relatou a presença de microrganismos produtores de biossurfactantes em solos, e verificou que pelo menos um microrganismo produtor foi encontrado em 20 dos 21 tipos de solo estudados, dentre eles os solos não-contaminados, solos contaminados com hidrocarbonetos, solos contaminados com metais ou contaminados com metais e hidrocarbonetos.

Devido ao fato de encontrar relatos na literatura de uma vasta gama de microrganismos promissores na produção de biossurfactantes isolados de vários ambientes, o presente estudo utilizou cepas isoladas de uma estação de tratamento de esgoto do campus do Pici (Universidade Federal do Ceará - UFC) e posteriormente investiu-se mais estudos em cepas isoladas de solo de manguezais do Ceará, Brasil. Todas as linhagens estudadas pertencem a coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Barreto (2011) e Lima (2013) isolaram e estudaram diversas cepas isoladas de manguezais do Ceará, como a prospecção ambiental de microrganismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes e a frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará, respectivamente. Constataram que os solos de manguezais representam ricas fontes de microrganismos produtores de tensoativos, os quais podem pertencer a classes já conhecidas ou novas classes dessas biomoléculas. Lima (2013), ao realizar o "estudo da frequência de isolados bacterianos produtores de surfactantes lipopeptídeos em sedimentos de dois manguezais do Ceará" obteve 200 isolados, destacando 65 deles pela produção de biossurfactantes, dos quais 18 são produtores de surfactina. Os resultados promissores obtidos pelos autores, levaram a busca de realizar mais avanços com algumas das cepas relatadas.

3.3. Metodologias Utilizadas para Caracterização de Substâncias Desconhecidas

3.3.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há mais de 10 anos na identificação de substâncias desconhecidas. A tecnologia FTIR permite uma rápida avaliação e identificação de uma grande variedade de produtos químicos. Uma das grandes vantagens desta técnica é a possibilidade de analisar amostras em praticamente qualquer estado físico. A introdução de espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) melhorou drasticamente a qualidade dos espectros no infravermelho e minimizou o tempo necessário para obtenção de dados (STUART, 2004).

A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e microondas. A porção de maior utilidade na análise e identificação de materiais está situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ e $25\text{ }\mu\text{m}$), denominado infravermelho médio.

Segundo Alves (2009) nesse sistema (FTIR), a radiação de uma fonte monocromática hipotética é dividida em dois feixes, cada um correspondendo idealmente a 50% do original, no "beamsplitter" (divisor de feixe). Um dos feixes (A) segue em direção ao espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o "beamsplitter", onde parte deste feixe reflete de volta para a fonte e parte vai para o detector. O outro feixe (B) parte do "beamsplitter" em direção ao espelho móvel. O espelho móvel também reflete o feixe B, parte de volta para a fonte e parte para o detector. Se a posição do espelho móvel é tal que o feixe B percorre a mesma distância que o feixe A antes de chegar ao detector ($\delta=n\lambda$, onde $n=0,1,2,\dots$), então os dois feixes estão em fase, reforçando um ao outro (interferência construtiva) e, neste caso, a energia que chega ao detector será máxima. Por outro lado, se a posição do espelho móvel for tal que o caminho do feixe B seja diferente daquele do feixe A por $(n+1)\lambda/2$, então os dois feixes estarão 90° fora de fase, cancelando um ao outro. A energia que chega no detector, nesse caso, será mínima.

A espectroscopia FTIR é uma variação da espectroscopia IR, a qual propicia vantagens como maior rapidez, alta reprodutibilidade e alta razão sinal/ruído. De tal maneira, constitui-se uma análise não destrutiva (ZENG *et al.*, 2007; SKORNYAKOV *et al.*, 2008).

Para seu funcionamento, utiliza-se de um feixe infravermelho que atravessa a amostra e detecta seus grupos funcionais expressos em vibrações moleculares, os quais refletem características químicas e bioquímicas da substância analisada.

3.3.2. Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry, MS)

A espectrometria de massa (Mass Spectrometry, MS) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais das amostras que se deseja avaliar. É considerada uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis aos cientistas, capaz de fornecer diversas informações sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (Espectrometria de Massa, 2013). Em termos práticos, a detecção por espectrometria de massa pode ser efetuada em dois modos distintos: varrimento total, em que são monitorizados todos os ions fragmentos formados e modo de ions pré selecionados (Selected Ion Recording - SIR ou Selected Ion Monitoring - SIM, designação do fabricante) em que apenas são monitorizados os ions previamente considerados como sendo de interesse para a caracterização (BORGES, 2007). Operações com detector de massas em modo SIR proporciona excelente sensibilidade com uma elevada especificidade, possibilitando inclusive, análise quantitativa.

3.4. Toxicidade e Biodegradabilidade e Tensoativos e Biotensoativos

3.4.1. Toxicidade de Tensoativos e Biotensoativos em Organismos Aquáticos

A toxicidade aquática de produtos tensoativos se estuda basicamente através de dois tipos de ensaio a saber: toxicidade aguda e toxicidade crônica.

No ensaio de toxicidade crônica determina-se a concentração de uma substância potencialmente tóxica, que causa algum efeito adverso após exposição durante um longo período ou ao longo da vida ou ciclo biológico de uma determinada espécie. No referido

ensaio, observa-se a mortalidade produzida, inibição do crescimento, perda de peso, deformações, efeitos sobre a reprodução, dentre outros. Tais ensaios são realizados utilizando como organismos de prova, peixes, microcrustáceos e algas.

A avaliação da toxicidade aguda é feita através das correlações entre sucessivas doses do composto tóxico e o efeito adverso produzido. As medidas geralmente empregadas são de EC₅₀ e LC₅₀, definidas como a concentração do produto que inativa ou causa mortalidade, respectivamente, de 50% dos organismos submetidos a prova.

Sabe-se que existem poucos dados disponíveis na literatura sobre a toxicidade dos agentes de superfície microbianas. Devido ao fato de uma legislação ambiental cada vez mais restritiva, testes de biodegradabilidade e toxicidade em organismos aquáticos têm sido cada vez mais usados como critérios importantes na seleção de tensoativos a serem empregados em detergentes domésticos e industriais (MADSEN *et al.*, 1996).

A extensa produção e utilização de hidrocarbonetos resultou numa alarmante contaminação ambiental por esses produtos químicos. Devido à sua toxicidade, há forte influência negativa sobre os organismos vivos, portanto é importante limpar os locais poluídos e para isso cada dia mais pesquisas buscam a aplicação de biossurfactantes.

A indústria mundial vêm descarregando uma ampla gama de surfactantes ou agentes de superfície, dejetos de suas instalações de tratamento de águas residuais. Uma vez utilizado, o surfactante entra nos corpos de água, onde podem causar sérios problemas se permanecerem ali por muito tempo, levando ao acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas e prejudiciais, causando sérios problemas ambientais (DESCHENES *et al.*, 1996; ABD-ALLAH, 1995; REBELLO *et al.*, 2014). Os surfactantes são ubíquos e nos efluentes não tratados, determinadas classes de surfactantes podem estar presentes em concentrações suficientes para constituir problemas de toxicidade para os organismos aquáticos (ANKLEY & BURKHARD, 1992), até mesmo entre 0,4 e 40 mg/L (ABEL, 1974). Existe uma extensa pesquisa sobre a toxicidade de surfactantes comerciais (LEWIS, 1991; SCHWEIGERT *et al.*, 2000; CHATURVEDI & KUMAR, 2010), no entanto, a avaliação do perfil de poluição de surfactantes é relevante. Rebello *et al.* (2014) relata várias pesquisas sobre a toxicidade e biodegradação e eliminação segura dos surfactantes aniônicos, sendo mais comumente usados e explorados o dodecilsulfato de sódio (SDS) e alquil linear benzeno sulfonato (LAS). É de suma importância obter informações sobre a via metabólica e mecanismo molecular de degradação de surfactante, bem como métodos e alternativas para combater o problema da contaminação com surfactantes. Como sabe-se que os surfactantes sintéticos são bem mais

agressivos que os biotensoativos produzidos por microrganismos, intensifica-se a pertinência e utilidade de biossurfactantes como uma alternativa para detergentes sintéticos atuais (Rebello *et al.*, 2014). Em linhas gerais, as concentrações de detergentes em águas residuais oscilam entre 1,0 e 20,0 mg/L enquanto em águas superficiais está em torno de 0,5 mg/L. O sabor na água com a presença de tensoativos se detecta a partir de 0,2 mg/L e a formação de espumas a partir de 0,3 mg/L. A presença de concentrações de 2,5 mg/L em água afetam o crescimento de plantas e concentrações entre 5,0 e 6,0 mg/L são tóxicas para algas e peixes em geral (MARTÍN, 1995). Esses dados são informados para uma ampla gama de tensoativos sintéticos.

Sandrin *et al.* (2000), relataram que os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos. Os autores aportam que o ramnolípídeo produzido por *P. aeruginosa* é capaz de complexar metais catiônicos como cádmio (Cd^{2+}), chumbo (Pb^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) e demonstraram ainda que o ramnolípídeo eliminou a toxicidade do cádmio, quando adicionado em uma concentração 10 vezes superior à concentração do metal.

Silva (2012), ao estudar sobre resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes para remoção na aplicação de poluentes ambientais gerados pela indústria do petróleo utilizando *Pseudomonas cepacea* CCT6659, avaliou a toxicidade do biossurfactante produzido frente a um microcrustáceo e a sementes de vegetais. Nos testes realizados com o biossurfactante bruto observou ausência de toxicidade frente ao microrganismo *Artemia salina* e a duas espécies de repolho *Brassica oleracea*.

Daphnia magna é uma espécie de *Daphnia* do gênero de crustáceos da ordem Cladocera, também chamada de "pulga d'água" ou "dáfnia", nativo do norte e oeste da América do Norte, Eurásia e algumas regiões da África. O uso de *Daphnia magna* para testes de ecotoxicidade é vantajosa em vários aspectos. Dafnídeos são pequenos, atingindo uma dimensão de cinco milímetros, de modo que um grande número pode ser criado num pequeno espaço. A Figura 3 apresenta um tipo de *Daphnia* e suas respectivas características.



Figura 3 - Foto de *Daphnia magna* e sua classificação científica. (Fonte: *Daphnia magna*, Straus, 1820; Taxonomic Serial No.: 83884)

Testes com *Daphnia magna* e nematóides são usados para avaliar o impacto tóxico de hidrocarbonetos em água antes e depois de um processo de mediação Biore (DIAMANTINO *et al.*, 2000). *Daphnia* é um gênero fundamental em corpos de água doce, pois são animais herbívoros eficazes sobre o fitoplâncton e é um alimento favorito de vertebrados e invertebrados predadores. A espécie *Daphnia magna* é amplamente utilizada como um organismo de teste em provas de toxicidade aguda e crônica no campo da ecotoxicologia. Além disso, é sensível a muitos produtos químicos tóxicos (SARMA *et al.*, 2003; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2005).

Sánchez-Leal (1995) relata que a toxicidade que os tensoativos apresentam em águas limpas é maior que em águas contaminadas, devido a adsorção dos tensoativos sobre a matéria orgânica em suspensão, reduzindo a quantidade de tensoativo na dissolução. O autor relata ainda que a toxicidade dos tensoativos deve-se fundamentalmente, a desestruturação que produzem nas membranas celulares, provocando um choque osmótico e alterações de permeabilidade das células. A maioria dos tensoativos apresentam-se mais tóxicos para espécies que possuem maior organização biológica, como peixes e menos tóxicos para as *Daphnias*. Ruiz (2010) observou em seus estudos que *Daphnia magna* apresentou sensibilidade inferior a bactérias luminiscentes *Vibrio fischeri*, com IC₅₀ entre 3,48 e 383,44 mg/L. Outro fator relatado na literatura é que a toxicidade também está relacionada a estrutura química do tensoativo, onde os valores de toxicidade são maiores para os tensoativos que possuem cadeia carbonada de maior longitude e de menor grau de etoxilação.

Poucos trabalhos estão disponíveis na literatura envolvendo pesquisas de toxicidade com algas. Os testes de toxicidade envolvendo algas sob diferentes condições físicas, químicas e biológicas, precisam ser melhorados, com métodos mais sensíveis, de

baixo custo e ecologicamente realistas. Amostras da água da bacia da Pampulha, Belo Horizonte, MG, foram avaliadas frente a alga *Selenastrum capricornutum* com testes de 96 h de exposição; os estudos realizados pelo Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Escola de Engenharia de São Carlos - USP mostraram efeito de inibição do crescimento da biomassa em relação ao controle, indicando toxicidade da água à esta espécie em todos os pontos de amostragem (principais tributários da lagoa da Pampulha, responsáveis pela entrada de efluentes industriais, e na própria lagoa). Apenas um dos pontos de amostragem, próximo ao aterro sanitário de BH apresentou toxicidade aguda para *Daphnia similis* (organismo também utilizado como bioindicador), com 100% de mortalidade (RIETZLER *et al.*, 1998).

Normalmente, as concentrações de tensoativo presentes no meio, são abaixo da CMC. Para o biossurfactante produzido por ICA56, a de IC₅₀ encontrada foi três vezes o valor da CMC, com concentração de 65,03 mg/L, portanto pode-se considerar seu uso seguro, uma vez que não serão aplicados valores maiores que a CMC. Para a saponina, tensoativo comercial testado, a concentração encontrada de IC₅₀ foi 36,92 mg/L. Paixão *et al.* (2002) ao avaliarem a toxicidade aguda do DSS para a microalga *Tetraselmis chuii*, durante 96 horas de exposição, obtiveram valores médios de CI₅₀, encontrados através do percentual de inibição do crescimento das microalgas foram de 11,21 mg/L a 21,87 mg/L. A CI₅₀ é definida como a concentração inibitória a 50% de organismos-teste, utilizada para a análise de ensaios com medidas de dados contínuos, assim como a reprodução. Ruiz (2010), ao avaliar a toxicidade de uma gama de tensoativos químicos do tipo ácidos alquil éter carboxílicos em microalgas do tipo *Selenastrum capricornutum*, obteve concentrações de EC₅₀ para AKYPO RLM-25, AKYPO RLM-100, AKYPO LF1 e AKYPO LF2 de 7,08 mg/L, 26,01 mg/L, 76,42 mg/L e 76,26 mg/L respectivamente enquanto para AKYPO LF4 e AKYPO LF6 encontrou valores de EC₅₀ de 331,89 mg/L e 750 mg/L, respectivamente.

Vibrio fischeri são gêneros de bactérias heterotróficas gram-negativas encontradas em águas temperadas e subtropicais. Sua luminescência é utilizada como recurso para estudar a toxicidade de ambientes aquáticos. A bioluminescência de *V. fischeri* é causada por cinco genes, luxCDABE, que são regulados por luxR e luxI. A emissão de luz ocorre a partir da oxidação de compostos orgânicos. As diferenças na quantidade de luz produzida pode, portanto, ser correlacionada com o metabolismo de organismos. A redução da luz emitida é proporcional à toxicidade da amostra testada.

A realização de estudos ecotoxicológicos é de extrema importância para monitorar, avaliar e compreender a extensão dos impactos ocasionados pela contaminação da

água, bem como possibilitar a criação de legislações e gerar informações para os setores responsáveis pela saúde pública e pelo ambiente, auxiliando na criação de políticas ambientais que possam garantir maior proteção ao meio ambiente (BARROS e DAVINO, 2003; BRIGANTE e ESPÍNDOLA, 2003). Ao estudar a toxicidade de um meio através da Ecotoxicologia, recomenda-se que se utilize mais de um organismo-teste adequado para as amostras coletadas, uma vez que a resposta de um único tipo de organismo pode diferir de outro, sobretudo quando a natureza da substância-teste é não é conhecida (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). Testes ecotoxicológicos vêm sendo desenvolvidos a fim de disponibilizar metodologias mais adequadas aos mais diversos meios, como é o caso de *Hyaella azteca* e *Vibrio fischeri* para sedimentos, se aprofundando no entendimento dos efeitos diretos ou indiretos de substâncias químicas para organismos-teste (HWANG *et al.*, 2009).

A Figura 4 apresenta amostras de colônias de *Vibrio fischeri* em uma placa de ágar sob luz normal (à esquerda) e no escuro (à direita), o que demonstra a produção de bioluminescência.

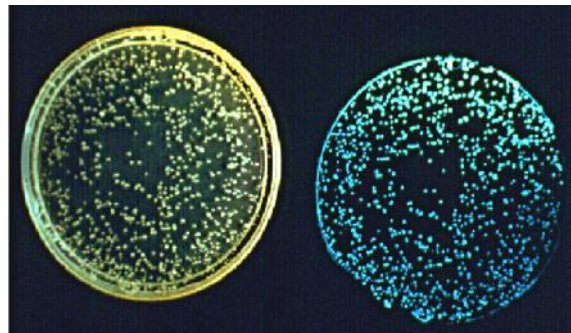


Figura 4 - Amostras de colônias de *Vibrio fischeri* em uma placa de ágar sob luz normal (à esquerda) e no escuro (à direita). (Fonte: *Vibrio fischeri* <<http://www.ou.edu/cas/botany-micro/faculty/dunn.html>>)

Vários autores relatam que bactérias *Vibrio fischeri* apresentam-se mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos derivados de ácidos aquil éter carboxílicos, como ocorre também para o tensoativo aniônico mais conhecido, o dodecil sulfato sódio (MARIANI, 2006 *apoud* RUIZ, 2010). Para *Vibrio fischeri*, Ruiz (2010) obteve valores de toxicidade de EC₅₀ entre 0,354 e 211,05 mg/L. No presente estudo, para os testes de toxicidade com o biossurfactante produzido por ICA56 obteve-se resultados em relação a toxicidade para *Vibrio fischeri*, concentrações de EC₂₀ ± 176,76 mg/L e EC₅₀ ± 912,35 mg/L após 15 minutos de exposição ao tóxico, enquanto para 30 minutos de exposição obteve-se EC₂₀ ± 159,42 mg/L e EC₅₀ ±

848,19 mg/L. Para saponina obteve-se $EC_{20} \pm 176,31$ mg/L e $EC_{50} \pm 652,68$ mg/L após 15 minutos de exposição e para 30 minutos os resultados obtidos foram $EC_{20} \pm 218,32$ mg/L e $EC_{50} \pm 578,38$ mg/L. Com isso, verificou-se que o biossurfactante produzido para causar morte de 50% dessa espécie necessita de quase 1,0 g/L, correspondente a 50 vezes sua CMC.

3.4.2. Biodegradabilidade de Tensoativos e Biotensoativos

Ao contrário de surfactantes sintéticos, os compostos produzidos por microrganismos, são facilmente degradados, tornando-os adequados para aplicações ambientais, tais como biorremediação e dispersão de derramamentos de petróleo, dentre outros MULLIGAN, 2005; MOHAN *et al.*, 2006). Os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, tornando-os adequados na biorremediação e tratamento de resíduos.

Diversos fenômenos indesejados em águas residuais estão interligados com a presença de tensoativos. Esses contaminantes tem uma ação destrutiva sobre a fauna e a flora quando presente em águas superficiais provocando sua eutrofização (CARA, 2012). Elevadas porcentagens de desses compostos são eliminados mediante processos de biodegradação e adsorção de sólidos em suspensão presentes nas águas, uma vez que os metabólitos gerados são dispersados em diferentes compartimentos ambientais (YING, 2006; CARA, 2012).

A biodegradação é o principal mecanismo de eliminação de compostos orgânicos no meio ambiente. O conhecimento da biodegradabilidade e toxicidade é uma necessidade para sua aplicação em formulações.

A biodegradação é influenciada por diversos fatores, dentre eles a CMC. Neste caso, o tensoativo com menor CMC apresenta maior biodegradabilidade, o que pode estar relacionado com a baixa presença do tensoativo livre, o qual tem um efeito inibitório no meio (JURADO, 2007 *apoud* RUIZ, 2010).

O crescimento do uso de surfactantes em processos de remediação de águas e de solos contaminados com poluentes orgânicos hidrofóbicos tem sido bastante limitado por falta de conhecimento sobre o destino desses compostos no ambiente, a biodegradação das moléculas e dos metabólitos intermediários, e ainda sobre a toxicidade quando aplicados *in situ* (HAIGH, 1996; FAVA & DI GIOIA *et al.*, 2004).

A maioria dos surfactantes podem ser degradados por microrganismos. No entanto, a degradação de alguns surfactantes sintéticos por atividade microbiana pode levar à geração de metabólitos tóxicos (VAN GINKEL *et al.*, 1996).

Em análises comparativas descritas na literatura, os tensoativos biológicos geralmente apresentam toxicidade inferior a apresentada por tensoativos sintéticos (MULLIGAN, 2005). uma das principais características que levam os biossurfactantes a estimularem a decomposição bacteriana de substâncias orgânicas hidrofóbicas é sua baixa toxicidade frente a bactérias e outros organismos unicelulares (MORAN *et al.*, 2000). A degradação biológica de surfactantes é o mais importante mecanismo para a remoção irreversível destas substâncias de ambientes aquáticos e terrestres e, por isso, a biodegradabilidade é considerada como uma característica importante em processo de avaliação quanto ao risco ambiental associado ao seu uso (LIMA, 2008).

Capítulo 4: Materiais e Métodos

4.1. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 e Caracterização do Produto Obtido

4.1.1. Matérias-primas para Ensaios com Resíduo Agroindustrial

O caju foi processado na Embrapa Agroindústria Tropical na Universidade Federal do Ceará, de acordo com algumas etapas da metodologia de Melo *et al.* (2000). Os frutos foram pré-selecionados, para retirar folhas, frutos estragados e outras sujeiras presentes e, em seguida, lavados em tanques com água clorada (10 ppm) e corrente (de preferência). O suco foi extraído em prensas do tipo *expeller*, um parafuso sem fim, forçando o suco para uma tela de aço inoxidável perfurada e com abertura de 0,5mm aproximadamente. O suco extraído foi colocado em um recipiente de aço inoxidável para o processo de clarificação, onde se adicionou uma solução de gelatina (10%), agitando lentamente, até o suco flocular. Vale salientar que a dosagem da gelatina pode variar, de acordo com as características do caju (matéria-prima). Após a clarificação, o suco foi deixado em repouso por um período de quinze minutos a meia hora, para completa sedimentação separando-se a polpa por gravidade. Finalmente, o suco clarificado foi filtrado para remoção da turbidez proveniente de precipitados, e distribuído em bombonas plásticas de 5 litros para armazenagem e mantido a -10°C, sem adição de conservantes.

4.1.2. Microrganismos

Utilizou-se cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 isolada de um tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do *Campus* do Pici da Universidade Federal do Ceará ETE-PICI (Giro *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013), uma bactéria produtora de biossurfactante selecionada em trabalhos anteriores do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos – GPBio. Todas as linhagens pertencem a coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Para manutenção dos microrganismos utilizou-se meio APGE composto por: peptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹ e ágar 15,0 g.L⁻¹, esterilizado a 121°C por 30 minutos, distribuído em placas de petri e tubos

rosqueados estéreis em capela microbiológica e, em seguida, incubados em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas. A cultura é mantida sob refrigeração a 4°C e repicada a cada 60 dias.

4.1.3. Inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo nutritivo, composto de suco de caju clarificado com concentração de ± 20 g/L de ART (Açúcares Redutores Totais) e adição de 1,0 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) ajustando-se o pH para 7,0. O meio foi esterilizado a 110°C por 10 minutos. Três colônias de cultura de *Bacillus subtilis* LAMI005 previamente incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas, em placas petri contendo meio APGE, foram transferidas para o caldo nutritivo e incubadas em agitador rotatório (*Shaker* Tecnal TE-480) por 24 horas, a 30°C, 180 rpm. Após 24 horas, a concentração do inóculo foi ajustada para uma faixa entre 0,1 – 0,2 em espectrofotômetro a 600 nm com um meio de cultivo previamente esterilizado de mesma composição do inóculo para propagação do mesmo.

4.1.4. Meios de Cultivo e Produção em Agitador Rotatório de Bancada

Utilizou-se como meio de cultivo para produção de biossurfactante com *Bacillus subtilis* LAMI005 suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0$ g.L⁻¹ de açúcares redutores totais (ART) com fonte de carbono. Essa concentração é obtida mediante diluição, partindo de uma concentração conhecida de glicose encontrada no suco estocado previamente analisado em HPLC. Como fonte de nitrogênio utilizou-se sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e posteriormente comparou-se com nitrato de amônio (NH₄NO₃).

Os meios de cultivo foram distribuídos em erlenmeyers com capacidade de 250 ml, contendo 50 mL de volume final para realização dos ensaios. Ajustou-se o pH do meio de cultivo a ser fermentado para 7,0 e esterilizou-se a 110°C por 10 minutos para não caramelização dos açúcares. Em testes para avaliação da influência do pH, ajustou-se para o

pH desejado (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0). Adicionou-se aos meios de cultivo 10% (v/v) de inóculo com absorvância previamente ajustada a 600 nm para uma faixa de 0,1 - 0,2.

4.1.5. Concentração de Biomassa

Acompanhou-se a concentração de biomassa pela medição da densidade óptica (D.O) à 600 nm, em espectrofotômetro (Genesys, série 20). A curva de crescimento celular foi determinada por peso seco obtido por filtração utilizando membrana (éster de celulose - Millipore) com diâmetro de poro de 0,45 µm, previamente pesada. Neste procedimento, filtra-se uma amostra de 5 mL do meio fermentado sob vácuo, lava-se três vezes com o mesmo volume de água destilada para remover completamente qualquer resíduo dos componentes do meio, coloca-se em estufa a 60°C até que se obtenha peso constante, segundo metodologia de Reis *et al.* (2004), com pequenas modificações. Em seguida, são feitas diluições do meio de cultivo do qual se retira o volume para obtenção de massa seca, para então se obter a curva de calibração da concentração de biomassa.

4.1.6. Acompanhamento da Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005

Dois métodos indiretos foram utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante, a determinação da tensão superficial e determinação do índice de emulsificação. Os resultados desses métodos são indicativos de produção. A concentração de surfactina e consumo de substrato por linhagens de *Bacillus* foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.1.6.1. Determinação da Tensão Superficial

Para avaliação da produção de biossurfactantes foi realizado medidas de tensão superficial do caldo livre de células, a 25°C, segundo o método de anel de Du Noüy, utilizando um tensiômetro Krüss, modelo K6 (COSTA *et al.*, 2006). O equipamento foi

previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura. Utilizou-se 30 mL de sobrenadante livre de células para cada amostra analisada. As análises foram realizadas em triplicata. A redução da tensão superficial foi calculada utilizando a Equação 1:

$$\text{Redução da Tensão Superficial} = \frac{TS_{t=Bco} - TS_{t=ti}}{TS_{t=Bco}} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde $TS_{t=Bco}$ é a tensão do meio utilizado como branco, onde não foi colocado inóculo e $TS_{t=ti}$ refere-se a amostra dos intervalos de tempo analisadas.

4.1.6.2. Determinação do Índice de Emulsificação

Outro método indireto aplicado indicativo de produção de biossurfactantes é a determinação do índice de emulsificação. O meio fermentado livre de células, retirados no período da fermentação foram testados quanto ao índice de emulsificação. O método consiste em colocar uma alíquota de amostra de meio contendo o biotensoativo em tubo de ensaio, com fundo chato, adicionando o mesmo volume de diferentes fontes hidrofóbicas como óleo de soja, querosene e n-hexadecano. Agitou-se em vórtex por dois minutos, em alta rotação deixando a emulsão em repouso por 24 horas (COOPER e GOLDENBERG, 1987; MAKKAR e CAMEOTRA, 1997). Os testes foram conduzidos em duplicata. Após 24 horas, calculou-se o índice de emulsificação através da razão entre a altura da região emulsificada e altura total, de acordo com a Equação 2, proposta por WEI *et al.*, 2005.

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde H_{FE} a altura da fase emulsionada e H_{TOTAL} a altura total da solução.

4.1.7. Extração de Biossurfactantes

Para extração de biossurfactantes, o caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos para separação da biomassa. Antes da remoção de células, verificou-se o pH,

ajustando-o a 7,0. Para extração e posterior quantificação do biossurfactantes produzido, ajustou-se o pH de 20 mL do sobrenadante livre de células para 2,0 com HCl 3N. O meio acidificado foi deixado em repouso overnight a 4°C para formação do precipitado. Após esse período, centrifugou-se a 10.000 g por 20 minutos, para recuperação do bioproduto produzido. Ressuspendeu-se o precipitado rico em biossurfactante, em 8,0 mL de água deionizada ajustando-se o pH para 8,0 para completa diluição do precipitado . Posteriormente adicionou-se o mesmo volume de cloreto de metileno para realizar uma extração líquido-líquido. Agitou-se a solução por 5 minutos, deixou-se em repouso por uma hora para separação do produto recolhendo em seguida em Becker de 100 mL. O procedimento foi repetido três vezes para melhor recuperação do produto. O solvente foi evaporado em capela química e o bioproduto foi posteriormente ressuspendido em metanol para quantificação e HPLC. A Figura 5 ilustra o processo de extração líquido-líquido da surfactina produzida para posterior quantificação.

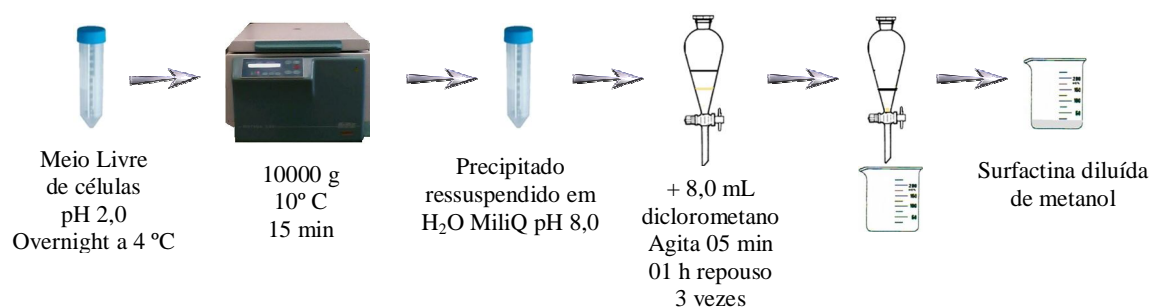


Figura 5 – Extração líquido-líquido do biossurfactante . Fonte: OLIVEIRA (2010).

4.1.8. Determinação da Concentração de Surfactina

Determinou-se a concentração de surfactina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), acoplado com detector UV e equipado com a coluna de fase reversa Symmetry C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, Irlanda). Utilizou-se fase móvel composta por 20% de solução de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80% de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a 30°C. A surfactina foi identificada usando detector UV, modelo 2487 (Waters) a 205 nm. A Figura 6 mostra a seqüência do preparo da amostra para quantificação em HPLC.

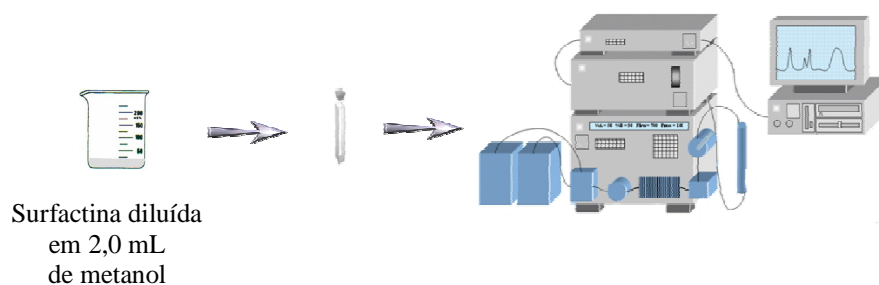


Figura 6 – Determinação da concentração de surfactina. Fonte: OLIVEIRA, 2010.

4.1.9. Determinação da Concentração de Substrato

Determinou-se a concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo Waters (Modelo 2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 40°C), coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm) e pré-coluna (5 cm x 4,6 mm) da Sigma Aldrich utilizando como fase móvel 0,1 % de H₃PO₄ em H₂O MiliQ, na vazão de 0,5 mL.min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL e o tempo de análise foi de 20 minutos, em duplicata.

4.1.10. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando um espectrômetro modelo FTLA 2000 - A ABB, com janela espectral de 400 a 4000cm⁻¹.

4.2. Screening de Cepas Produtoras de Biosurfactantes Isoladas de Solos de Manguezais do Estado do Ceará (Brasil)

4.2.1. Microrganismos Testados

Para avaliação da produção de biossurfactantes selecionaram-se 5 cepas pertencentes a coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As cepas de *Bacillus sp.* isoladas de solos de manguezais, foram identificadas pelo LABIOTECH como Jag248 e Jag249, ICA12, ICA24 e ICA56, isoladas de solos do Rio Jaguaribe (Jag) e Icapuí (ICA) respectivamente. Para manutenção dos microrganismos utilizou-se o mesmo procedimento descrito em 4.1.2.

4.2.2. Inóculo

Para os testes com as cepas isoladas de solos de manguezais foram testados diferentes tipos de inóculo a fim de otimizar a produção. O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo nutritivo, com composição de acordo com os meios de cultivo a serem utilizados, mantendo a concentração fonte de carbono e fonte de nitrogênio. Ao utilizar de suco de caju clarificado, a concentração da fonte carbono foi de \pm 20 g/L de ART (Açúcares Redutores Totais - glicose e frutose), no caso da utilização de glicose padrão analítico (P.A) a concentração foi de 10 g/L, sempre com adição de 1,0 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) como fonte de carbono ajustando-se o pH para 7,0. O meio foi esterilizado a 110°C por 10 minutos. Três colônias da cultura a ser cultivada, previamente incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas, em placas petri contendo meio APGE, foram transferidas para o caldo nutritivo e incubadas em agitador rotatório (Shaker Tecnal TE-480) por 24 horas, a 30°C, 150 rpm. Após 24 horas, a concentração do inóculo foi ajustada para uma faixa entre 0,1 – 0,2 em espectrofotômetro a 600 nm com um meio de cultivo previamente esterilizado de mesma composição do inóculo para propagação do mesmo.

4.2.3. Meios de Cultivo e Produção em Agitador Rotatório de Bancada

Em ensaios realizados utilizando suco de caju clarificado como meio de cultivo para produção de biossurfactante a concentração foi de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares redutores totais (ART) com fonte de carbono. Essa concentração é obtida mediante diluição, partindo de uma concentração conhecida de glicose encontrada no suco estocado previamente analisado em HPLC. Para demais cultivos, utilizou-se também meio mineral segundo Mórán *et al.* (2000), com modificações, composto por glicose (10,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L), Na_2HPO_4 (6,0 g/L), KH_2PO_4 (3,0 g/L), NaCl (2,7 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g/L) e 0,1% de solução de micronutrientes composto por $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10,95 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0 g/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,54 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,39 g/L), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/L) e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (0,17 g/L). A partir da composição do meio mineral segundo Mórán *et al.* (2000) formularam-se outros meios e testou-se. Foram testados os meios (A) suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g/L ART}$) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L) + Extrato de Levedura (5,0 g/L); (B) suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g/L ART}$) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L) + Na_2HPO_4 (6,0 g/L); (C) suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g/L ART}$) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L) + KH_2PO_4 (3,0 g/L); (D) suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g/L ART}$) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L) + NaCl (2,7 g/L); (E) suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g/L ART}$) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g/L); (F) Meio Mineral + suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g/L ART}$) + Solução de Micronutrientes; (G) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes; (H) Meio Mineral.

4.2.4. Concentração de Biomassa

Acompanhou-se a concentração de biomassa pela medição da densidade óptica (D.O) à 600 nm, em espectrofotômetro (Genesys, série 20). O procedimento consiste em adicionar 3 alçadas de colônias do microrganismo, após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 30°C, a um caldo nutritivo para propiciar o crescimento do microrganismo. Colocou-se em agitador rotatório a 30°C, 150 rpm por 24 horas. Após esse período, centrifugou-se a 1000 g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. As células foram lavadas e centrifugadas 3 vezes. Ressuspendeu-se as células em 30 mL de água destilada. Colou-se 5 mL da solução concentrada de células em 3 cadinhos previamente pesados para

secar em estufa com circulação de ar a 40°C por 24 horas, pesando após esse período até obter peso constante. Pesou-se pelo menos três vezes. Com o restante da solução concentrada de células fez-se diluições e mediu-se a absorbância a 600 nm para obtenção da curva de crescimento celular.

4.2.5. Acompanhamento da Produção de Biossurfactante por Cepas Produtoras de Biossurfactantes Isoladas de Solos de Manguezais do Estado do Ceará - Brasil

Dois métodos indiretos foram utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante, a determinação da tensão superficial e determinação do índice de emulsificação descritos posteriormente. Ambos estão descritos nos itens 4.1.6.1 e 4.1.6.2 respectivamente. Os resultados desses métodos são indicativos de produção. A concentração de surfactina e consumo de substrato produzida por linhagens de *Bacillus*, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nos itens 4.1.7, 4.1.8 e 4.1.9 estão descritos respectivamente os procedimentos de extração de biossurfactantes, determinação da concentração de surfactina e determinação da concentração de substrato.

4.3. ICA56: Produção de Enzimas, Caracterização do Biossurfactante Produzido, Avaliação da Toxicidade e Biodegradabilidade

4.3.1. Tensão Superficial e Determinação da Concentração Micelar Crítica

A tensão superficial (ST) das soluções de biossurfactante (BS) foram determinadas mediante o método da placa Wilhelmy (tensiômetro Kruss K11) a 25°C, 45°C e 65°C. Preparou-se uma solução de biossurfactante de concentração conhecida (10,0 g/L), dissolvendo-se o bioproducto liofilizado (sem qualquer purificação adicional além da precipitação ácida em pH 2,0 para recuperação do bioproducto) em água MilliQ pH 8,0 ajustado com soluções de NaOH (3M) e/ou HCl (3M), conforme necessário. O pH final da

solução de BS deve estar entre 7,5 e 8,0 para completa dissolução do bioproduto. A partir desta solução prepararam-se outras soluções com diferentes concentrações de BS para realização da análise (0,001 a 0,06 g/L nas temperaturas de 25°C e 45°C e de 0,001 a 0,5 g/L a 65°C). As medidas de ST foram realizadas no mínimo três vezes, obtendo-se os valores de ST médio e desvio-padrão. Os valores de concentração micelar crítica (CMC) do BS foram determinadas graficando-se os valores de tensão superficial obtidos experimentalmente frente ao logaritmo da concentração do biosurfactante (Altmajer Vaz *et al.*, 2012).

4.3.2. Tensão Interfacial e Ângulo de Contato

A tensão interfacial (IFT) do sistema solução aquosa de biosurfactante/óleo lubrificante foi determinada a 25°C, 45°C e 65°C, usando diferentes concentrações de surfactante (20, 40 e 60 mg/L). Utilizou-se lamínulas revestidas com Parafilm© (Brand GMBH, Wertheim) como superfície para a gota na análise do ângulo de contato. Os valores de ângulo de contato (CA) entre as soluções biosurfactante e o Parafilm© (Brand GMBH, Wertheim) foram determinadas a 25°C. Ambas as medidas foram realizadas em triplicata através da técnica de gota séssil (Van Oss *et al.*, 1988), empregando para tal um tensiômetro de gota (KSV K100, de KSV, Finlândia). Para a determinação da tensão interfacial, ajustou-se o perfil da gota formada mediante a Equação de Young-Laplace (Shaw, 1992). A determinação do ângulo de contato é realizada traçando-se a tangente ao perfil da gota, obtida a partir de análise da imagem. Ambos cálculos são realizados automaticamente mediante emprego do software específico proporcionado pelo próprio fabricante do equipamento utilizado, tensiômetro de gota (KSV K100, de KSV, Finlândia). Ensaios de controle foram realizados utilizando água milliQ.

4.3.3. Ensaio de Aplicação do Biosurfactante Produzido para a Remediação do em Solos Contaminados com Óleos Lubrificantes

A metodologia utilizada para avaliar o potencial de aplicabilidade do BS à remediação de solos contaminados encontra-se descrita no trabalho publicado por Moya-

Ramírez *et al.*, (2014). Sucintamente, o método requer a realização de 4 etapas: (1) adição do corante Sudan III ao óleo lubrificante; (2) contaminação da areia com o óleo lubrificante preparado na etapa 1; (3) desenvolvimento do processo de lavagem da areia contaminada em condições experimentais controladas; (4) etapa final de quantificação da porcentagem de remoção do contaminante. Em cada teste experimental foram utilizados 10 g de areia de mar lavada marca PANREAC (pH: 6,4; porosidade: 0,47; densidade: 2,65 g/cm³, 25°C; Tamanho de partícula: 0,25 – 0,30 mm) previamente contaminada com óleo lubrificante em uma proporção 5:1 p/p. A areia contaminada é depositada em uma coluna de vidro termostática de 8,5 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro interno (Figura 7). Um vidro poroso é colocado no fundo da coluna para impedir a eluição do solo. A solução de lavagem (0,5 L) contida no interior do tanque encamisado é bombeada para a coluna com um caudal descendente de 20 L/h. No final do processo, quando a coluna está livre da solução de limpeza, tomam-se três amostras da areia lavada (de 1 g, aproximadamente) e seca-se em estufa a 65°C durante 24 h. A eficiência do processo (detergência, DE) é determinada comparando-se a quantidade de óleo lubrificante aderido a areia ao final do ensaio com relação a quantidade existente inicialmente, de acordo com a Equação 3:

$$DE (\%) = \frac{(O_i - O_f)}{O_i} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde O_i é a massa inicial de óleo lubrificante presente na areia e O_f é a massa de óleo residual ao final do processo de lavagem.

A Figura 7 é um modelo representativo do sistema utilizado para realização do ensaio de remediação em solos contaminados com óleo lubrificante utilizando o biossurfactante produzido pelo microrganismo ICA56.

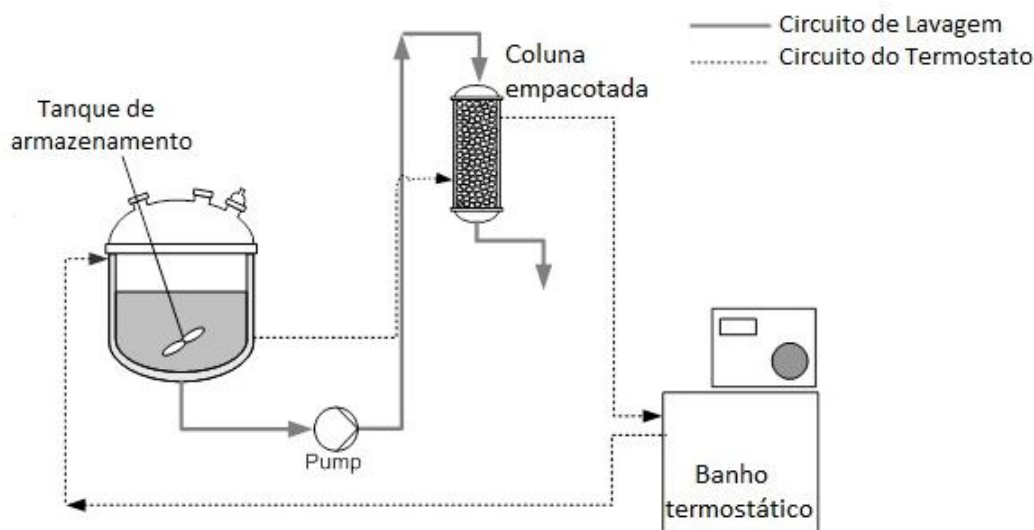


Figura 7 – Esquema do dispositivo experimental utilizado para os ensaios de remediação.

A quantidade de óleo lubrificante residual aderido à areia ao final de cada experimento é determinada mediante extração com solvente iso-octano e leitura espectrofotométrica a 300 nm (Espectrofotômetro Cary Bio 100). Os valores de absorvância das amostras são então comparados com uma curva de calibração que relaciona concentração do óleo lubrificante e absorvância.

Para construção da curva de calibração, foram realizadas as seguintes etapas:

- Adicionou-se Sudan III ao óleo em uma proporção de 0,064% p/p, agitando sob leve aquecimento por 30 minutos para completa dissolução do corante; Posteriormente filtrou-se para eliminar resíduos do corante não dissolvido;
- Fez-se uma reta padrão do óleo que foi adicionado ao corante diluindo com iso-octano iniciando com uma solução de 8,0 g/L, sendo a absorvância medida a 300 nm;
- Para contaminar a areia utilizou-se a proporção areia/óleo 50/10 p/p;
- Pesou-se um filtro de papel e um funil limpos para colocar a areia contaminada com óleo a fim de eliminar o óleo excedente, com um Becker abaixo do sistema deixando filtrar por 48 horas;
- Após este período, retirou-se toda a areia possível e pesou-se o filtro e o funil juntos.

Com essas informações calcula-se % em peso de óleo que tem na areia com a Equação 4 abaixo:

$$A_i = \frac{Mac - a_e - a_r}{Mar + Mac - a_e - a_r} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

- Mac y Mar são as massas, em g, de óleo e areia utilizadas para o ensaio;
- a_e lé a quantidade de óleo que escorre ao deixar em repouso, que a temperatura ambiente vai ser zero;
- a_r é a quantidade de óleo retida no filtro e no funil, obtida pela diferenças de pesos.

4.3.4. Estabilidade da Emulsão

A estabilidade das emulsões formadas por soluções de diferentes concentrações de biossurfactante (0,1, 0,5 e 1,0 g/L) e dodecano (Sigma Aldrich) foi avaliada a 25°C, mediante medidas de retrodifusão (LUMiCheck ®, a partir de LUM, Alemanha) durante 24 horas. A percentagem de luz dispersada (“scattered light”) é função da concentração da fase dispersa (dodecano) na emulsão, sendo que a redução na intensidade da luz dispersada que retorna ao longo do tempo é devido à desestabilização da emulsão. Todas as medidas de estabilidade foram realizadas em triplicata. A medida da estabilidade da emulsão é fornecida pelo equipamento a cada intervalo de tempo programado.

Para a formação das emulsões de óleo em água empregou-se um agitador UltraTurrax® (Ika-Werke, Staufen, Alemanha), 10 ml de solução de biotensoativo nas concentrações citadas acima e 10 ml de dodecano foram adicionados a um béquer de vidro e submetidos a agitação (13000 rpm) durante 1 min. A emulsão formada foi distribuída em vials e inseridos no equipamento programado para medição a intervalos de tempo durante 24 horas mantido a 25°C.

4.3.5. Índice de Emulsificação

Os ensaios de índice de emulsificação foram realizados durante 14 dias, empregando soluções com diferentes concentrações do biossurfactante (0,1, 0,5 e 1,0 mg/L), e seguindo metodologia descrita por Altmajer Vaz *et al.*, (2012). Basicamente, o teste consiste

na realização das seguintes etapas: (a) transferir a um tubo de ensaio 2 ml da solução de biossurfactante e 2 ml de dodecano; (b) agitar o tubo de ensaio usando vórtex (velocidade máxima) durante 2 minutos; (c) deixar os tubos em repouso a temperatura controlada e, (d) com auxílio de uma régua milimetrada, medir a altura total de líquido no interior do tubo de ensaio, assim como a altura da emulsão formada. Para determinar o índice de emulsificação utiliza-se a Equação 2, definida no item 4.1.5.1. Os valores de índice de emulsificação foram determinados ao longo do tempo. No primeiro dia as emulsões foram medidas com maior frequência (0, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h e 8h, 24 h) e posteriormente a intervalos de tempo maiores: 48, 72, 96, 120, 192, 264 e 336 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.6. Estabilidade do Biossurfactante Produzido Frente à Temperatura, pH e Concentração de NaCl

O efeito da temperatura, do pH e da concentração de sal (NaCl) sobre a estabilidade do biossurfactante foi avaliado mediante medidas de tensão superficial das soluções de biossurfactante utilizando um tensiômetro Kruss K11 pelo método da placa Wilhelmy a diferentes tempos: 1h, 24h, 48h e 72h. Em todos os experimentos, utilizou-se uma solução de BS cuja concentração corresponde à concentração micelar crítica (CMC) a 25°C (20 mg/L).

Ressalta-se que o biossurfactante utilizado é proveniente de uma solução concentrada previamente preparada (10 g/L) a partir da diluição do bioproduto (recuperado por precipitação ácida a pH 2,0), centrifugado, concentrado e liofilizado) em água MilliQ e ajustando-se o pH final a 7,5 - 8,0 com soluções de NaOH (3M) e/ou HCl (3M) conforme necessidade. A Tabela 3 apresenta as variáveis que foram estudadas para avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido por ICA56 frente a temperatura, pH e sal.

Tabela 3 - Variáveis estudadas nos ensaios de estabilidade do biossurfactante produzido por ICA56.

Variável em estudo	Valores
Temperatura (°C)	25°C, 45°C e 65°C 120°C por 60 minutos (autoclave)
pH	2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12
Concentração de NaCl (g/L)	10, 20, 30, 40 e 50

4.3.7. Ensaio de Biodegradabilidade

Realizaram-se dois tipos de ensaios de biodegradabilidade: (a) primeiramente avaliou-se a capacidade de degradação do biossurfactante por parte do microrganismo *Pseudomonas putida*. Este teste tem duração de 72 horas; (b) Posteriormente, realizou-se o ensaio denominado método estático, com duração de 28 dias, seguindo a NORMA UNE 55-844-91, aplicada para avaliação da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos e não iônicos comerciais empregados na formulação de detergentes.

4.3.7.1. Ensaio de Biodegradabilidade Utilizando Pseudomonas putida

A metodologia adotada nos testes de biodegradabilidade com *Pseudomonas putida* encontra-se descrita no trabalho de Lechuga *et al.* (2012). Basicamente, o teste consiste nos seguintes passos: (a) repicar placas com o microrganismo; (b) incubar as placas a 30°C por 24 horas; (c) transferir as colônias para um meio nutritivo; (d) incubar a 30°C o erlenmeyer de capacidade de 50 mL contendo 20,0 mL contendo meio de cultivo e as colônias que foram transferidas, por 24 horas; (e) inocular (utilizando 200 µL de inóculo de *P. putida*) cada erlenmeyer de capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo contendo concentrações conhecidas de biotensoativo a ser ensaiado e incubar por 72 horas, 30°C em banho termostaticado com agitação (100 rpm) para manter a temperatura constante e evitar a adesão de bactérias as paredes dos erlenmeyers. A quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) foi avaliada ao principio e final do experimento (0 e 72h) a fim de verificar a biodegradabilidade do biotensoativo mediante medidas da quantidade de carbono orgânico total, TOC (Analisador de Carbono Orgânico Total, TOC-VCSH, Shimadzu). A eficiência da biodegradação do biotensoativo foi calculada pelo emprego da Equação 5 (Cara, 2012):

$$E_f = \frac{COD_i - [(COD_f - COD]_m)}{COD_i} \times 100$$

Equação 5.

Onde:

COD_i é o carbono orgânico dissolvido no meio líquido no início do cultivo;

COD_f é o carbono orgânico dissolvido no meio líquido no final do ensaio;

COD_m é a concentração mínima de carbono orgânico que não pode ser metabolizada pelas células (este valor é obtido com as amostras do branco, na ausência do tensoativo).

Para compor o meio de cultivo (solução nutriente), foram preparadas duas soluções, uma de compostos inorgânicos e outra de elementos traço, esterilizadas a 121°C por 10 minutos. Na Tabela 4 se apresenta a composição do inóculo, meio de compostos inorgânicos e solução de elementos traço.

Tabela 4- Composição do inóculo, meio de compostos inorgânicos e elementos traço.

Inóculo	<ul style="list-style-type: none"> • 1,0 g/L de extrato de carne • 2,0 g/L de extrato de levedura • 5,0 g/L de peptona • 5,0 g/L de NaCl • 15,0 g/L de Agar
Solução de compostos inorgânicos	<ul style="list-style-type: none"> • 1,0 g/L de NH₄Cl • 1,0 g/L de K₂HPO₄ • 1,0 g/L de KH₂PO₄ • 1,0 g/L de MgSO₄.7H₂O
Solução de elementos traço	<ul style="list-style-type: none"> • 0,98 g/L de CaCl₂.2H₂O • 1,0 g/L de MnSO₄.H₂O • 0,8 g/L de Fe(NH₄)₂SO₄.7H₂O • 0,2 g/L de ácido nitrilotriacético

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados em duplicata em erlenmeyers de 250 mL (volume final de 100 mL), adicionando-se 50 mL do meio de compostos inorgânicos, 1,0 mL de solução de elementos traço, solução de biotensoativo (volume variável, em função da concentração desejada em 100 mL), e água Milli-Q para completar o volume de 100 mL. A seguir, ajustou-se o pH final da solução em 7,0 mediante adição de NaOH 1,0 M. Inoculou-se cada erlenmeyer com 200 µL de meio de cultivo previamente

preparado com *P. putida*. Os erlenmeyers foram então mantidos baixo agitação (130 rpm), a 30°C por 24 horas. Incubou-se os meios de cultivo inoculados em agitador com banho termostaticado a 130 rpm, 30°C, por 72 horas em ambiente escuro.

4.3.7.2. Ensaio de Biodegradabilidade: Método estático

O ensaio de biodegradabilidade realizado com base as pautas da norma UNE 55-844-91 (denominado “método estático”) consiste em inocular uma pequena quantidade de microrganismos aeróbios, procedentes de uma população mixta e aerada, em um meio aquoso nutritivo de composição química definida apto para o crescimento microbiano (Cara, 2012; Ruiz, 2010). O inóculo utilizado foi obtido na estação depuradora de águas residuais urbanas “UTE EDAR GRANADA SUR” (Granada, Espanha).

Para compor o meio de cultivo (solução nutriente), foram preparadas quatro soluções distintas (Tabela 5), esterilizadas a 121°C por 15 minutos. O meio de cultivo é preparado adicionando 0,1% das soluções A, B, C e D em água destilada. Nesse meio aquoso adicionaram-se diferentes concentrações conhecidas do biotensoativo a avaliar, considerando-se o volume a ser ensaiado. Utilizou-se erlenmeyers de 2,0 L de capacidade, contendo 1,2 L de meio de cultivo contendo biotensoativo em sua composição. Adicionou-se aos meios, 0,5 ml de inóculo proveniente da estação depuradora de águas residuais urbanas “UTE EDAR GRANADA SUR” (Granada, Espanha) e incubou-se a 25°C ± 1°C, com uma agitação de 125 rpm em ambiente escuro.

Tabela 5 - Composição das soluções utilizadas no teste de biodegradabilidade realizado segundo a norma UNE 55-844-91

Solução A	<ul style="list-style-type: none"> • 8,5 g/L de KH₂PO₄ • 21,75 g/L de K₂HPO₄ • 33,4 g/L de Na₂HPO₄.2H₂O • 1,70 g/L de NH₄Cl
Solução B	<ul style="list-style-type: none"> • 22,50 g/L de MgSO₄.7H₂O
Solução C	<ul style="list-style-type: none"> • 27,5 g/L de CaCl₂
Solução D	<ul style="list-style-type: none"> • 0,25 g/L de FeCl₃.6H₂O

As concentrações de biotensoativo estudadas foram: 0 (Branco), 10, 25, 50, 100 e 200 mg/L. Ao longo de 28 dias (duração do experimento), analisou-se o consumo de carbono orgânico dissolvido (COD) retirando-se uma alíquota de 25 ml e determinando-se o conteúdo da amostra em carbono orgânico total (TOC) nos tempos correspondentes a: 0h, 7h, 24h (1 dia), 31h, 48 h (2 dias), 72h (3 dias), 96h (4 dias), 168h (7 dias), 216h (9dias), 288h (12 dias), 336h(14 dias), 408h (17 dias), 528h (22 dias), 600h (25 dias) e 672h (28 dias). Calculou-se a porcentagem de carbono orgânico dissolvido residual (% COD Residual) de acordo com a Equação 6, a porcentagem de biodegradação final (% Biodegradação Final) através da Equação 7 e a porcentagem de eficiência da biodegradação, mediante o emprego da Equação 8.

$$Residual = \frac{[COD]_t}{[COD]_0 \cdot 100} \quad \text{Equação 6}$$

$$\%Biodegradação\ Final = \frac{[COD]_0 - [COD]_t}{[COD]_0 \cdot 100} \quad \text{Equação 7}$$

$$\%Eficiência\ da\ Biodegradação = \frac{([COD]_0 + [COD]_{Branco}) - [COD]_t}{[COD]_0 \cdot 100} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

COD_t – Concentração de carbono orgânico dissolvido no meio líquido em um instante “t”;

COD_{Branco} – Concentração de carbono orgânico dissolvido no meio líquido livre de biotensoativo (Branco);

COD_0 – Concentração de carbono orgânico dissolvido no meio líquido no início do ensaio.

4.3.8. Toxicidade em Organismos Marinhos

A toxicidade do biossurfactante produzido foi estudada mediante três métodos distintos, realizando-se testes com microalgas (*Selenastrum Capricornutum*), com o microcrustáceo *Daphnia magna* e com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. Os

procedimentos empregados para a realização dos referidos testes encontram-se descritos a continuação.

4.3.8.1. Toxicidade do Biossurfactante em Microalgas (*Selenastrum Capricornutum*)

Os testes com microalgas foram realizados conforme a Norma UNE-EN ISO 28692:1994, que baseia-se na inibição do crescimento de algas de água doce (espécie *Selenastrum capricornutum*) pelo composto que se deseja estudar. Utilizou-se o Kit ALGALTOXKIT FTM, de acordo com a norma ISO 28692 e com OECD Guideline 201 (OECD, 1984). O teste baseia-se na medida da densidade óptica (OD) a 670 nm de um meio líquido nutritivo com composição similar a água doce adicionado de uma suspensão de algas e diferentes concentrações do agente cuja toxicidade deseja-se determinar (em nosso caso, o biossurfactante). Os resultados são então comparados com os obtidos em um ensaio controle (ausência de biossurfactante). As medidas de densidade óptica são convertidas em termos de concentração de algas utilizando uma reta padrão que faz parte do kit, bem como as soluções para preparar a água doce.

Seguindo as recomendações do fabricante, os seguintes componentes do kit devem ser guardados em ausência de luz e baixo refrigeração (+5/-2°C): tubos com algas, “matrix dissolving médium” e “concentrated algal growth médium”.

Para a preparação de 1 litro de meio de cultivo adicionam-se 10 mL da solução nutriente A e 1,0 mL das soluções nutrientes B, C e D em um balão volumétrico, ajustando-se o volume final a 1 litro. A continuação, ajusta-se o pH da solução a $8,0 \pm 0,2$ mediante adição de HCl (1M) ou NaOH (1M). Depois da preparação da solução, a mesma deve ser mantida em refrigeração e ausência de luz.

Para ativação das algas seguem-se os seguintes passos:

- Elimina-se cuidadosamente o líquido do tubo que contem as esferas de algas;
- Adiciona-se 5,0 mL da solução "Matrix dissolving medium" fornecida no kit de análise;
- Agita-se vigorosamente o tubo, e repete-se este processo a cada 2 minutos até que a matriz de algas imobilizadas esteja completamente dissolvida (para acelerar o processo, recomenda-se o uso de um agitador do tipo vórtex);
- Centrifuga-se a 3000 rpm por 10 minutos, eliminado-se o sobrenadante;

- Adiciona-se 10 mL de água desionizada ao tubo, e agita-se vigorosamente até completa homogeneização dos componentes;
- Centrifuga-se novamente (3000 rpm, 10 min), eliminando-se o sobrenadante e voltando a ressusender a fase sólida em 10 mL de meio de cultivo.

O procedimento adotado para a preparação do inóculo concentrado de algas consiste fundamentalmente nas seguintes etapas:

- Colocar a suspensão de algas em um balão volumétrico de 25 mL e aferir a medida adicionando meio de cultivo e homogeneizar;
- Transferir o meio de cultivo a cubeta "Calibracion long cell" e realizar o zero da calibração em espectrofotômetro a 670 nm;
- Medir a absorbância da suspensão de algas usando a cubeta "Algal Stock";
- Substituindo-se o valor obtido da OD na reta padrão (kit), determina-se a concentração de algas N1;
- Calcula-se o fator de diluição para obter uma concentração N2 de 1.10^6 algas/mL de acordo com a Equação 9;

$$\text{Fator de diluição} = \frac{N1}{N2} \qquad \text{Equação 9}$$

- Transferir o conteúdo da "Algal stock" para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar o volume necessário para obter a concentração 1.10^6 algas/mL;
- Adicionar 25 mL da solução preparada à cubeta de medida, medir a OD e verificar alcançou a concentração desejada;
- Caso a concentração seja superior, voltar a realizar as etapas anteriores; caso seja inferior, concentrar a suspensão por sedimentação natural das algas (30 minutos a 1 hora), remover a parte do líquido procedente da parte superior da cubeta e repetir a operação de diluição.

A preparação das soluções do tóxico (substância que deseja-se determinar a toxicidade) a serem testadas implica a realização das seguintes etapas:

- Preparar 6 diluições diferentes de tóxico utilizando meio de cultivo, neste caso o biossurfactante produzido por ICA56 e saponina (biossurfactante comercial). Incluir uma solução com concentração zero de tóxico (Branco);

- Após preparar as soluções de tóxico, adicionar 1,0 mL da suspensão de algas com concentração de 1.10^6 algas/mL a fim de obter uma concentração em torno de 1.10^4 algas/mL em cada frasco fechando bem e agitando;
- Medir a OD e anotar os valores no tempo zero.

O processo de incubação dos cultivos de algas foi realizado segundo o seguinte procedimento:

- As cubetas são colocadas na caixa plástica transparente do seu kit com as tampas abertas em um dos lados, por uma espécie de régua plástica colocada na tampa das cubetas. Posteriormente cobre-se com parafilm para evitar evaporação;
- As cubetas devem ser colocadas na caixa plástica de forma aleatória para evitar possíveis diferenças devido o recebimento de luz influenciado pela posição;
- Incuba-se durante 72 horas, em estufa com temperatura controlada constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e com iluminação de pelo menos 10000 lux para ambos os lados das cubetas e 3000 - 4000 lux no fundo;
- A orientação das cubetas deve ser sempre a mesma durante as 72 horas de incubação e agitadas sempre antes de cada medida de OD, que é realizada para cada cubeta em zero, 24, 48 e 72 horas; O ensaio é realizado em triplicata para cada concentração, inclusive o controle (zero tóxico ou Branco).

O protocolo estándar para o teste de toxicidade em algas estabelece que as mesmas devem estar continuamente em suspensão para facilitar a transferência de CO_2 e reduzir a variação de pH. A ressuspensão uma vez ao dia antes de medir a OD é suficiente para obter o número mínimo de divisões de algas (Rios, 2010).

Após obter a medida de OD para cada concentração de biossurfactante ao longo do experimento, representa-se o logaritmo da densidade óptica, $\text{Log}(\text{OD})$, frente ao tempo, obtendo-se uma linha reta. A taxa de crescimento das microalgas (*Selenastrum Capricornutum*) para cada concentração pode ser determinada a partir da pendente de dita reta. A taxa de crescimento (μ) avalia-se mediante a Equação 10:

$$\mu(Cx) = \frac{\log OD_{72 \text{ horas}} - \text{Log} OD_{0 \text{ horas}}}{72 \text{ horas}}$$

Equação 10

Onde:

$\log OD_{72 \text{ horas}}$ é logaritmo da medida de absorvância a 670 nm no tempo de 72 horas;

$\log OD_{0 \text{ horas}}$ é logaritmo da medida de absorvância a 670 nm no início do experimento.

Com a taxa de crescimento para cada concentração (μ_{cx}) e para o controle (μ_{c0}) pode-se avaliar a taxa de inibição (γ), para cada concentração com a Equação 11:

$$\% \gamma (Cx) = \frac{\mu_{c0} - \mu_{cx}}{\mu_{c0}} \cdot 100 \quad \text{Equação 11}$$

O valor de toxicidade expressa-se como IC_{50} , que corresponde a concentração de um determinado agente de poder tóxico em mg/L que produz inibição de 50% no crescimento depois de 72 horas em exposição a essa substância. Representa-se o logaritmo da concentração da substância teste em função da taxa de inibição em %. Na representação dos dados, pode-se ajustar uma linha reta mediante o método dos mínimos quadrados, avaliando, obtendo-se a Equação 12:

$$\text{Log}[\text{biotensotivo}] = A \cdot \% \gamma + B \quad \text{Equação 12}$$

Avaliando-se a 50% a taxa de inibição, obtém-se o valor para IC_{50} .

4.3.8.2. Toxicidade do Biossurfactante ao Microcrustáceo *Daphnia magna*

A análise de toxicidade com *Daphnia magna* foi realizada conforme a Norma UNE-EN ISO 6341:1996 (UNE EN ISO 6341:1996) e com OECD Guideline 202 (OECD, 1984). Utilizou-se para os testes o Kit DAPHTOXKIT FTM magna, onde os microrganismos de prova são microcrustáceos, *Daphnia magna* Straus (*Clodocera*, *Crustacea*). A medida se baseia na morte ou imobilização dos microcrustáceos como consequência do efeito tóxico do produto testado após 24 horas de exposição, neste caso, o biossurfactante produzido. Para fins

de comparação, os mesmos ensaios foram realizados com a saponina, um tensoativo comercial.

Os efípios de *Daphnia magna* são recebidos em tubos plásticos cobertos com papel alumínio (MicroBioTest Inc.), e devem ser armazenados em refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e escuridão.

A água doce (Freshwater) é preparada em 2,0 L de água desionizada, adicionando os vials recebidos no kit DAPHTOXKIT FTM e respeitando a sequência indicada na Tabela 6. Uma vez preparada a solução de água doce, guarda-se a mesma baixo refrigeração e ausência de luz.

Tabela 6 - Soluções empregadas na preparação de água doce.

Ordem de adição dos componentes	Número do vial	Composição
1°	Vial 1	Solução de NaHCO ₃
2°	Vial 2	Solução de CaCl ₂
3°	Vial 3	Solução de MgSO ₄
4°	Vial 4	Solução de KCl

O Kit traz ainda spirulina em pó para alimentar as *Daphnias*. Para a preparação das soluções de biotensoativo a ensaiar utiliza-se água doce para fazer a diluição e alcançar as concentrações desejadas.

Para a incubação do efípios de *Daphnia magna* seguiu-se o seguinte procedimento:

- Tirar os efípios da refrigeração e eliminar o líquido de conservação; Lavar com cuidado para não perder os efípios até eliminar todos os traços do meio de armazenamento;
- Colocar os efípios de *Daphnia magna* em uma placa petri contendo 50 mL de água doce, previamente aerada durante 15 minutos e temperatura de 20 - 22°C;
- Incubar os ovos de *Daphnia magna* durante três dias com temperatura controlada de 20 - 22°C e com iluminação de 6000lux;
- A cada 24 horas é necessário renovar a água doce e substituí-la por uma nova aerada e com temperatura de 20 - 22°C

Neonatos nascidos antes de 24 horas do início do ensaio devem ser eliminados. Após as 72 horas, os organismos a serem testados estarão disponíveis. Duas horas antes de

iniciar o ensaio, deve-se alimentá-los com uma suspensão de espirulina para evitar morte por inanição. Utilizam-se placas com multipocilhos (pertencentes ao kit, 6 filas, com 5 poços cada), adicionando-se 10 ml de solução de biotensativo preparadas com água doce nas concentrações a serem testadas. Transfere-se 20 neonatos para o primeiro poço da placa (lavado) e a partir desse transfere-se cinco neonatos para os demais poços, evitando-se assim a diluição da solução a ser testada no momento da transferência. Cobre-se a placa com Parafilm© e coloca-se sua tampa, mantendo em incubação a 20°C, em escuridão, durante 24 horas para primeira contagem dos organismos imobilizados. A contagem é repetida com 48 horas de experimento. Consideram-se organismos imobilizados os neonatos que não são capazes de nadar depois de uma suave agitação do líquido por 15 segundos, inclusive se não podem mover suas antenas.

Somando o número de imobilizados e dividindo pelo número total de organismos testados para cada concentração (utilizou-se 20 neonatos) obtém-se a % do efeito, de acordo com a Equação 13:

$$\%Efeito = \frac{N^{\circ} \text{ imobilizados}}{20} \quad \text{Equação 13}$$

O valor da toxicidade se mede como IC₅₀, que é a concentração do agente testado em mg/L capaz de produzir imobilização de 50% da população depois de 24 horas de exposição ao tóxico. O cálculo se realiza representando o logaritmo da concentração do agente testado em função da porcentagem do efeito. Na representação dos dados pode-se ajustar uma linha reta mediante o método dos mínimos quadrados, de forma que com a Equação 14 pode-se calcular o valor para IC₅₀.

$$\log[\text{tensativo}] = A \cdot \%efeito + B \quad \text{Equação 14}$$

Avaliando para 50% a taxa de inibição se obtém os valores de EC₅₀.

4.3.8.3. Toxicidade do Biossurfactante em Bactérias Marinhas Luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177

Os ensaios de toxicidade realizados utilizando bactérias marinhas luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 como microrganismos de prova, mediante o método

LUMIStox, seguiram a NORMA UNE-EN ISO 11348-2. A medida de toxicidade neste ensaio baseia-se na inibição da intensidade luminosa da bactéria marinha depois de um determinado tempo de exposição com a substância a ser avaliada a intensidade tóxica e um controle não tóxico.

O procedimento de reativação das bactérias consiste na realização das seguintes etapas:

- Descongelar a solução de reativação em um becker com água e agitar vigorosamente. Após descongelada, mantê-la a 15°C no equipamento que será realizado o teste (Lumistherm) durante 15 minutos;
- Transcorridos os 15 minutos, retirar as bactérias de *Vibrio fisheri* do congelador, agitar suavemente no vial durante 2 minutos em um becker com água a temperatura $T < 25^{\circ}\text{C}$;
- Adicionar 0,5 mL da solução de reativação ao vial de bactérias, agitar suavemente até formar uma suspensão. Manter o vial a 15°C no Lumistherm durante 15 minutos;
- Após os 15 minutos, mesclar as bactérias e suspensão com o restante da solução de reativação e homogeneizar suavemente e adicionar 0,5 mL dessa solução as cubetas a serem ensaiadas, de B1 a B10 e de C1 a C10 e termostatar a 15°C no Lumistherm durante 15 minutos.

As soluções a serem testadas devem ser preparadas com solução de NaCl 2%. No equipamento existem três filas para 10 amostras, numeradas de A1 a A10, B1 a B10 e C1 a C10. As soluções contendo o agente tóxico devem ser postas na fila A, de A2 a A10 com volume de 1,5 mL, seguindo a ordem da concentração crescente, de A1 a A10. Na cubeta A1 coloca-se apenas solução de NaCl 2%, pois nas células (não sei se este é o melhor termo) B1 e C1 se disporá o controle (sem adição de agente tóxico).

No presente método, podem-se fazer diluições sucessivas a partir de uma amostra inicial ou preparar soluções conhecidas para ensaiar. No caso de diluições sucessivas, a solução de maior concentração deve estar inserida em A10 com volume de 3,0 mL. Neste caso, coloca-se 1,5 mL de solução de NaCl 2% nas cubetas de A1 a A9 e transfere-se 1,5 a partir da cubeta A10 que tem a solução concentrada do agente tóxico a ensaiar para A9, de A9 para A8 e assim sucessivamente para realizar a série de diluições que será de 50% de uma para outra. Ao transferir para a solução de bactérias realiza-se outra diluição de 50%.

O procedimento de medição adotado é o seguinte:

- Transcorridos os 15 minutos de termostatização da solução de bactérias iniciar as medidas a partir da cubeta B1; Inserir a cubeta e medir; Extrair a cubeta, e colocá-la novamente em B1 e adicionar 0,5 mL da amostra procedente de A1;
- Inserir a cubeta C1 e medir; Extrair a cubeta, e colocá-la novamente em C1 e adicionar 0,5 mL da amostra procedente de A1;
- Realizar o mesmo procedimento para todas as cubetas das filas B e C adicionando sempre a amostra correspondente da fila A.
- Mede-se ao fim de cada 15 e 30 minutos conforme solicitação do equipamento. Após realizadas todas as medidas o equipamento imprime a folha de resultados de medida de intensidade luminosa lidas.

Os valores iniciais de intensidade luminosa medida para todas as amostras do ensaio são corrigidos mediante um fator que leva em conta a diminuição da intensidade luminosa que se produz de forma natural, mesmo na ausência de amostra tóxica. A Equação 15 é utilizada para calcular a correção:

$$f_k = \frac{I_t(0)}{I_0(0)} \quad \text{Equação 15}$$

Onde:

f_k - fator de correção para o tempo de incubação de 15 a 30 minutos;

$I_0(0)$ - intensidade luminosa em tempo zero, antes da adição de solução diluente (solução de NaCl 2% adicionada de agente tóxico);

$I_t(0)$ - intensidade luminosa após um período de incubação de 15 e 30 minutos;

O efeito inibitório da amostra ensaiada para um tempo de incubação "t", calcula-se utilizando a Equação 16:

$$H_t = \frac{I_{0t}(c) - \overline{I_t}(c)}{I_{0t}(c)} \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

Onde:

$$I_{0t}(c) = \overline{f_k} \times I_0(c)$$

Sendo $\overline{f_k}$ o fator de correção médio das amostras controle.

Para avaliação das relações concentração/efeito, calcula-se para cada nível de diluição a função Gama (Γ). Esta função é a razão entre a intensidade da luz perdida pela solução de bactérias e sua diminuição após expostas a ação da amostra tóxica, podendo ser avaliada pela Equação 17:

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{100 - \bar{H}_t} = \frac{f_k \cdot I_0(c) - I_t(c)}{I_t(c)} \quad \text{Equação 17}$$

Onde:

$I_0(0)$ e $I_t(0)$ são as leituras de intensidade luminosa das cubetas de concentração zero a tempo zero e "t";

$I_0(c)$ e $I_t(c)$ são as leituras de intensidade luminosa das cubetas de concentração C a tempo zero e "t";

\bar{H}_t é a média de H_t .

A partir dos resultados obtidos deduz-se uma relação linear entre a função Γ e a concentração do tensoativo empregado, de acordo com a Equação 18:

$$\log(C) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a) \quad \text{Equação 18}$$

Onde:

$\log(C)$ é o logaritmo das concentrações de agente tóxico utilizada no ensaio;

b é o valor da pendente da reta descrita;

$\log(\Gamma)$ é o logaritmo dos valores calculados de Gama (Γ) no ensaio;

$\log(a)$ é o valor da ordenada na origem da reta descrita.

O valor da toxicidade mede-se como EC_{50} e EC_{20} e são, respectivamente, a concentração de tensoativo em mg/L que produz uma inibição de 50% e de 20% depois de 15 ou 30 minutos de exposição ao tóxico. Os valores de EC_{50} e EC_{20} são calculados dando a Γ os valores de 1,0 e 0,25 respectivamente.

4.3.9. Inibição do Crescimento do Microrganismo Produtor de Biossurfactantes ICA56 em Placas Contendo Diferentes Contaminantes

Para a realização deste teste, utilizou-se placas petri contendo meio nutritivo (APGE) e com poços perfurados contendo diferentes tipos de contaminantes (1 – Óleo de motor usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20 p/p); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo Arabia ligero (“Arabian light”) oriundos de Cepsa Química, Espanha. As placas foram repicadas com o microrganismo ICA56, aplicou-se os contaminantes ($\pm 600 \mu\text{L}$) nos poços perfurados na placa e incubou-se em estufa a 30°C. Verificou-se o crescimento após 24 e 48 horas para avaliar se os produtos aplicados impediriam o crescimento do microrganismo.

4.3.10. Degradação de Contaminantes em Placa por ICA56

Após os testes de inibição, verificou-se o potencial do microrganismo ICA56 em degradar os contaminantes anteriormente citados (Tópico 4.3.9). O ensaio consiste em pesar 10 g de areia de mar lavada (Panreac) e impregná-la com 1% do contaminante, adicionando a seguir 1% de inóculo bacteriano. Para os ensaios de degradação com petróleo, variou-se também as concentrações aplicadas do mesmo, sendo as proporções de areia/petróleo/inóculo 10:1:1; 10:2:1 e 10:3:1. Para os outros produtos a proporção foi areia/óleo de motor usado/inóculo 10:1:1, areia/mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20 p/p)/inóculo de 10:1:1, areia/mescla de óleo de girassol/oliva virgem (80:20 p/p)/inóculo de 10:1:1. Para este teste, utilizou-se a metodologia de Bueno *et al.*, (2010), com modificações. A degradação foi acompanhada de 0 a 15 dias com fotos durante esse período para comparar a evolução da degradação.

4.3.11. Produção de Enzimas

A presença de enzimas lipases, proteases e amilases foi avaliada de forma qualitativa.

Para determinar a produção da enzima protease, utilizou-se a metodologia adaptada de Orlandelli *et al.* (2011). Placas de Petri contendo 20 ml de meio ágar-gelatina-leite (18 g ágar, 10 g leite em pó desnatado; 10 g de gelatina em pó incolor sem sabor; 1000 ml de água destilada) foram inoculadas e incubadas em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Observou-se a produção de enzimas após este período pela formação de um halo incolor ao redor do poço inoculado. Os testes foram realizados em triplicata.

Para avaliar a produção da atividade lipolítica utilizou-se a metodologia adaptada de Hankin e Anagnostakis (1975). Preparou-se placas de Petri contendo 10g de Peptona, 5g de Cloreto de Sódio, 0,1g de Cloreto de Cálcio Bihidratado, 20g de Ágar, 10 ml de Tween 20 e 1000ml de Água Destilada. As placas foram inoculadas e incubadas em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e os ensaios foram conduzidos em triplicata. A produção da enzima foi observada pela formação de um halo opaco ao redor da colônia após o período de incubação.

A composição do meio para detecção de amilase foi de 20 g de glicose, 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 5,0 g de amido, 20 g de ágar para 1 L de água destilada (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975; Vincent, 1970). O meio foi autoclavado a 121°C , por 15 minutos. A placa foi revelada com vapor de iodo sublimado até que estivesse com completa coloração roxa.

4.3.12. Caracterização do Biossurfactante Produzido por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há mais de 10 anos na identificação de substâncias desconhecidas. A tecnologia FTIR permite uma rápida avaliação e identificação de uma grande variedade de produtos químicos. A análise foi realizada em um equipamento Jasco – FTIR/6200, Acumulação: 100 scans; Resolução: 2 cm^{-1} ; Janela espectral: $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$; Detector: TGS (triglycine sulfato). Foram feitas pastilhas

brometo de potássio com o biossurfactante liofilizado para realização da análise. Analisou-se o biossurfactante produzido por ICA56 e a surfactina padrão (Sigma Aldrich).

4.3.13. Espectrometria de Massa

As análises foram realizadas em um cromatógrafo UPLC Waters Acquity H-Class, acoplado com uma coluna Waters UPLC BEH C-18 100 nm, operando a 40°C. O volume de injeção foi de 3,0 microlitros. A fase móvel A utilizada foi água com 0,1% peso de fórmico e a fase móvel B, acetonitrila com 0,1% peso fórmico. Com uma caudal de 0,5 mL/min com 20% V da fase A e 80% da fase B. O espectrofotômetro de massa é Waters Xevo-T9S. As condições de trabalho foram: “Polarity ES+, Capillary (kV) 3, Source Temperature 150°C, Desolvation Temperature 500 °C, Desolvation gas flow 800 L/h”. O modo de trabalho é em SIR (Selected ion recording), ou seja, o espectro de massa detecta somente moléculas com peso molecular indicado. Os pesos moleculares foram: 982,60, 994,60, 1008,60, 1022,60, 1036,60, 1050,60 e 1064,60, correspondentes aos identificados na surfactina padrão.

Capítulo 5: Resultados e Discussões

5.1. Avaliação de diferentes parâmetros na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 e caracterização do produto obtido

5.1.1. Influência do pH

Estudou-se a influência do pH sob a produção biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em suco de caju clarificado suplementado com 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

A Figura 8 mostra os resultados experimentais para concentração de células e de surfactina, bem como a conversão do substrato e da tensão superficial do meio fermentado livre de células.

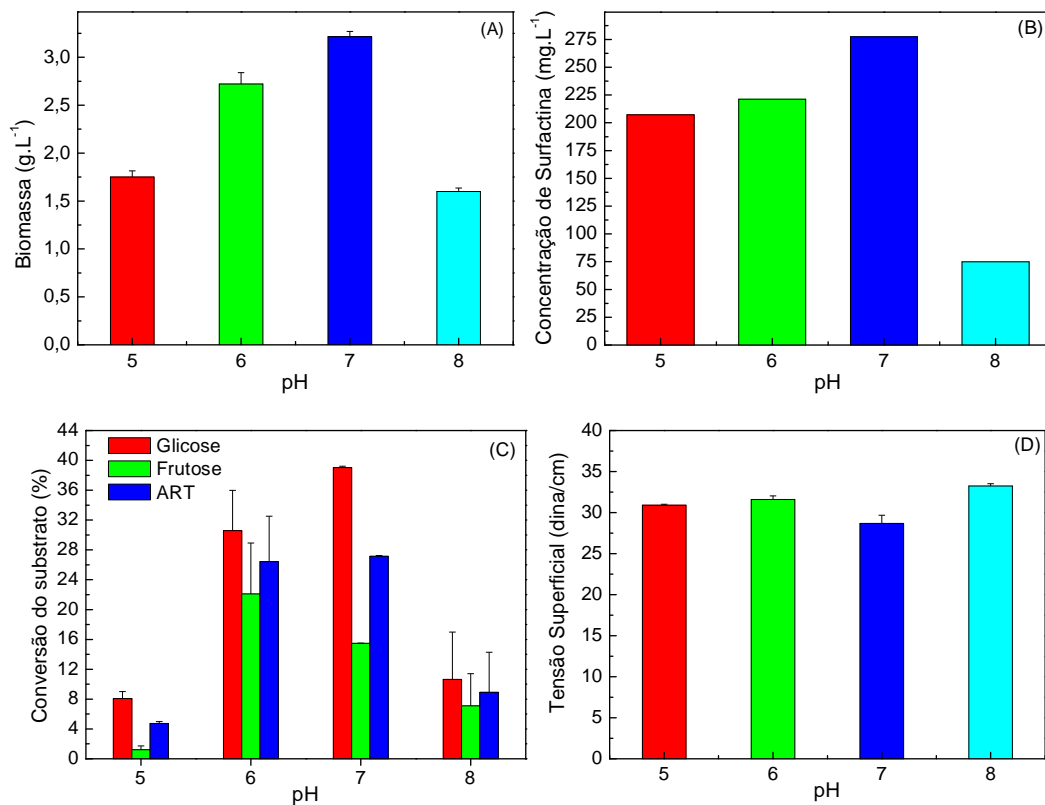


Figura 8- Influência do pH do meio de cultura sob a concentração da biomassa (A), concentração surfactina (B), conversão do substrato (C) e tensão superficial do meio livre de células (D) durante a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado no suco de caju clarificado (concentração de açúcar inicial ± 20 g.L⁻¹).

Conforme mostra a Figura 8, *Bacillus subtilis* LAMI005 foi capaz de crescer e produzir biossurfactante em diferentes valores de pH (5,0-8,0). Valores da tensão superficial foram baixos (menos de 35 mN/m) para a maioria dos ensaios, indicando produção de biossurfactante. Pode-se observar aumento crescente da concentração de biomassa e surfactina como aumento dos valores de pH de 5,0 a 7,0, diminuindo quando utilizou-se o pH = 8,0. A conversão de substrato foi maior em pH 6 e 7, quando as concentrações mais elevadas de surfactina também foram observadas. A produção ideal de biossurfactante foi observada em pH 7, mais de 275 mg /L de surfactina. Em pH 5,0 e 6,0, quase 205 e 225 mg/L foi produzido, respectivamente.

Makkar & Cameotra (2002) obtiveram resultados semelhantes ao estudar a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* MTCC 2423 em diferentes valores de pH no meio, variando de 4,5 a 10,5. Além disso, a produção de surfactina foi mantida em uma faixa de pH (5-7). Em pH 5,0 e 6,0, obteve-se concentrações em torno de 205 e 225 mg/L, respectivamente. A concentração de surfactina alcançada em pH 7,0 foi de apenas 1,3 vezes maior do que a concentração obtida em pH 5,0. Estes resultados sugerem que os biossurfactantes pode ser efetivamente usado para produção em larga escala, onde mudanças inesperadas no pH podem ocorrer (PRUTHI & CAMEOTRA, 2003).

5.1.2. Avaliação da Adaptação da Cepa em Placas com Diferentes Meios

Com o intuito de diminuir o tempo de ensaio para produção do biossurfactante, resolveu-se começar pela redução do tempo de preparação do inóculo. Utilizando os meios de cultivo tradicionais em placas APGE, o inóculo tardava em torno de 40 a 46 horas para apresentar-se com uma concentração celular ideal para o início dos ensaios, visto que o mesmo era diluído para alcançar uma absorbância mais próxima de 0,2. Resolveu-se adaptar o microrganismo ao meio de cultivo utilizado, começando com a placa de repique. Realizaram-se dois ensaios, um com o repique tradicional, em placas APGE (Ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) e outro em placas com o meio de cultivo onde o microrganismo é cultivado adicionado de ágar (15,0 g.L⁻¹ de Ágar, suco de caju clarificado com concentração de ART de ± 20,0 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio). As placas foram repicadas com o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, incubadas a 30°C por 24 horas e posteriormente

foram transferidas três alçadas da cultura para o caldo nutritivo contendo suco de caju clarificado ($\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ART) e sulfato de amônio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$).

Utilizando placas preparadas com o mesmo meio de cultivo onde o microrganismo será cultivado, o inóculo demorou apenas 24 horas para ficar pronto, reduzindo o tempo de processo de produção.

A Figura 9 (A e B) apresenta os resultados obtidos para os ensaios realizados com placas APGE e placa contendo suco de caju clarificado para consumo de substrato, concentração celular e produção de surfactina.

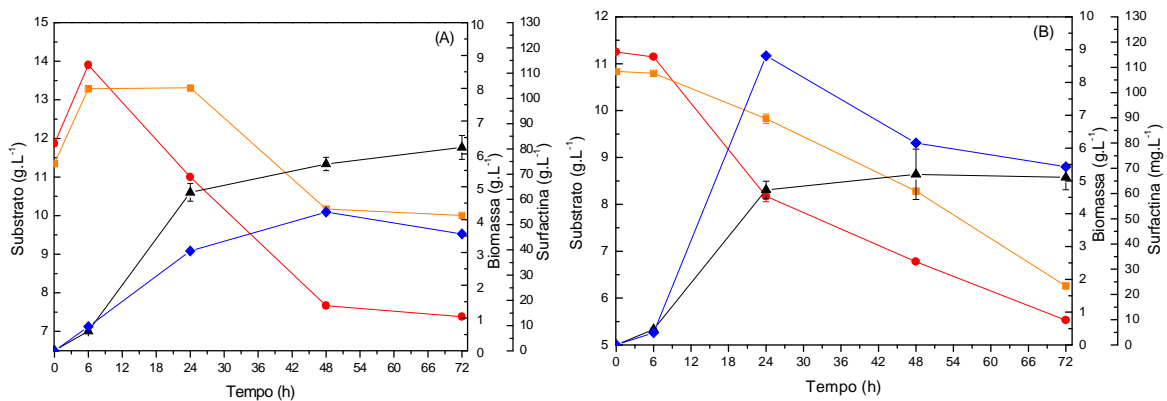


Figura 9 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) e variação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (A) Placa APGE; (B) Placa contendo CAJC, ágar e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentrações iniciais de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$. (▲) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (■) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

Observa-se pelas Figuras que no ensaio realizado com placa contendo suco de caju clarificado (Figura 9B), houve maior consumo de substrato, com concentração final de $5,52 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e $6,26 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de frutose. De acordo com os resultados, pode-se observar na Figura 9A que o consumo do substrato é bastante decrescente e, onde o crescimento celular estabiliza, em torno de 24 horas, observa-se também maior produção de surfactante. Acredita-se que a redução na concentração do bioproduto é pelo consumo do próprio microrganismo, visto que o biossurfactante também tem carbono e por já haver uma menor concentração de glicose e frutose presente no meio, o mesmo pode passar a consumir o produto excretado. No ensaio com placa APGE (Figura 9A) a produção de surfactina é crescente até 48 horas, com concentração de $54,96 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$, havendo uma redução na concentração para $46,31 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$, com 72 horas de ensaio. Para a outra condição estudada

(Figura 9B), a maior concentração obtida foi no tempo de 24 horas, com concentração de $114,57 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$, reduzindo para $70,63 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ após 72 horas de ensaio. A concentração de biomassa são semelhantes para as duas condições estudadas, apresentando-se entre 5,0 e 6,0 g.L^{-1} .

A Tabela 7 apresenta os resultados para índice de emulsificação (IE_{24}) a partir do sobrenadante livre de células com diferentes fontes hidrofóbicas para as duas condições de cultivo estudadas.

Tabela 7- Resultados obtidos de Índice de Emulsificação (IE) para os ensaios realizados variando o meio de cultivo em placa, utilizando meio APGE (Ágar, Peptona, Glicose e Extrato de levedura) e CAJC+A+(NH₄)₂SO₄ (CAJC - suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ART), 15,0 g.L^{-1} de Ágar e 1,0 g.L^{-1} de (NH₄)₂SO₄).

Amostra	Placa APGE		Placa CAJC+A+(NH ₄) ₂ SO ₄	
	Querosene	Óleo de Soja	Querosene	Óleo de Soja
48 h	$65,90 \pm 2,3$	$65,56 \pm 3,3$	$65,90 \pm 2,3$	$13,34 \pm 0,3$
72 h	$67,67 \pm 0,7$	$63,63 \pm 0,0$	$62,41 \pm 6,7$	$63,85 \pm 6,8$

Amostras do ensaio realizado com repique em placa APGE apresentaram índice de emulsificação superior a 60% tanto para querosene como para óleo de soja, enquanto amostras do ensaio com repique em placa CAJC (Placa CAJC+A+(NH₄)₂SO₄), apresentaram melhores resultados de estabilidade com querosene, e com óleo de soja apenas para a amostra do tempo de 72 horas, também com emulsões superiores a 60%.

A Tabela 8 apresenta resultados de tensão superficial (mN/m) e pH obtidos nos ensaios realizados citados acima.

Observa-se pela Tabela 8, que houve redução da tensão superficial de 40% em relação ao branco (meio de cultivo que não foi adicionado células), já em relação a água a redução apresenta-se em torno de 60%. OS resultados foram observados em ambas as condições estudadas, indicando que houve produção do biotensoativo e exibindo excelente atividade tensoativa. Os resultados aqui obtidos assemelham-se aos dados de Barros *et al.*, (2008), Nitschke e Pastore (2006), dentre outros.

Tabela 8 - Resultados obtidos de Tensão superficial (TS) e pH para os ensaios realizados variando o meio de cultivo em placa, utilizando meio APGE (Ágar, Peptona, Glicose e Extrato de levedura) e CAJC+A+ (NH₄)₂SO₄ (CAJC - suco de caju clarificado com concentração de ± 20,0 g.L⁻¹(ART), 15,0 g.L⁻¹ de Ágar e 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄).

Tempo (h)	Ensaio 1- TS (mN/m) Placa APGE	pH	Ensaio 2 - (mN/m) Placa CAJC+A+ (NH ₄) ₂ SO ₄	pH
MC	50,00 ± 0,00	6,17 ± 0,01	51,85 ± 0,27	6,25 ± 0,02
0	48,07 ± 0,80	6,25 ± 0,01	48,08 ± 0,20	6,33 ± 0,02
6	31,25 ± 0,82	6,51 ± 0,06	32,00 ± 0,00	6,62 ± 0,01
24	30,00 ± 0,84	6,17 ± 0,38	30,50 ± 0,55	5,89 ± 0,41
48	28,58 ± 0,66	5,86 ± 0,23	30,00 ± 0,00	6,26 ± 0,74
72	30,17 ± 0,41	6,59 ± 0,10	30,00 ± 0,00	6,93 ± 0,11

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

5.1.3. Influência da Concentração de (NH₄)₂SO₄ como Fonte de Nitrogênio

Sabe-se que a fonte de nitrogênio é um fator muito importante na produção de biossurfactantes. Seu tipo e concentração influem fortemente no comportamento do microrganismo para a excreção do produto desejado. A limitação em muitas situações também pode atuar de maneira positiva, fazendo com que o microrganismo consuma mais intensamente a fonte de carbono, e assim, excretar uma maior quantidade de produto. A adição de aminoácidos e hidrolisados de proteínas favorecem fortemente o crescimento da maioria dos microrganismos heterotróficos, sendo muito comum a adição de fontes orgânicas como peptona (hidrolisados de proteínas), extrato de levedura, extrato de carne e extrato de malte (MULLIGAN & GIBBS, 1989; BEZERRA, 2006), no entanto, são fontes caras que podem ser substituídas pelos sais de amônio, fontes de nitrogênio mais econômicas, levando em consideração a disponibilidade dos materiais necessários ao processo e o baixo custo na produção.

Tendo em vista que o suco de caju é um potencial substrato a ser estudado, uma vez que é uma matéria-prima rica em carboidratos, fibras, vitaminas e sais minerais de grande abundância na região Nordeste e oriundo de resíduos do caju da agroindústria do estado do Ceará, estudos utilizando suco de caju clarificado têm sido realizados (ROCHA *et al.*, 2006).

Avaliou-se no presente estudo a influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactantes pela linhagem de *Bacillus subtilis* LAMI005, cultivado em suco de caju clarificado como fonte de carbono e (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio. As

concentrações estudadas para a fonte de nitrogênio citada foram de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ respectivamente.

A Figura 10, onde pode-se observar os conjuntos de dados expressos nos gráficos A, B e C, mostram o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para os ensaios realizados variando a concentração de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

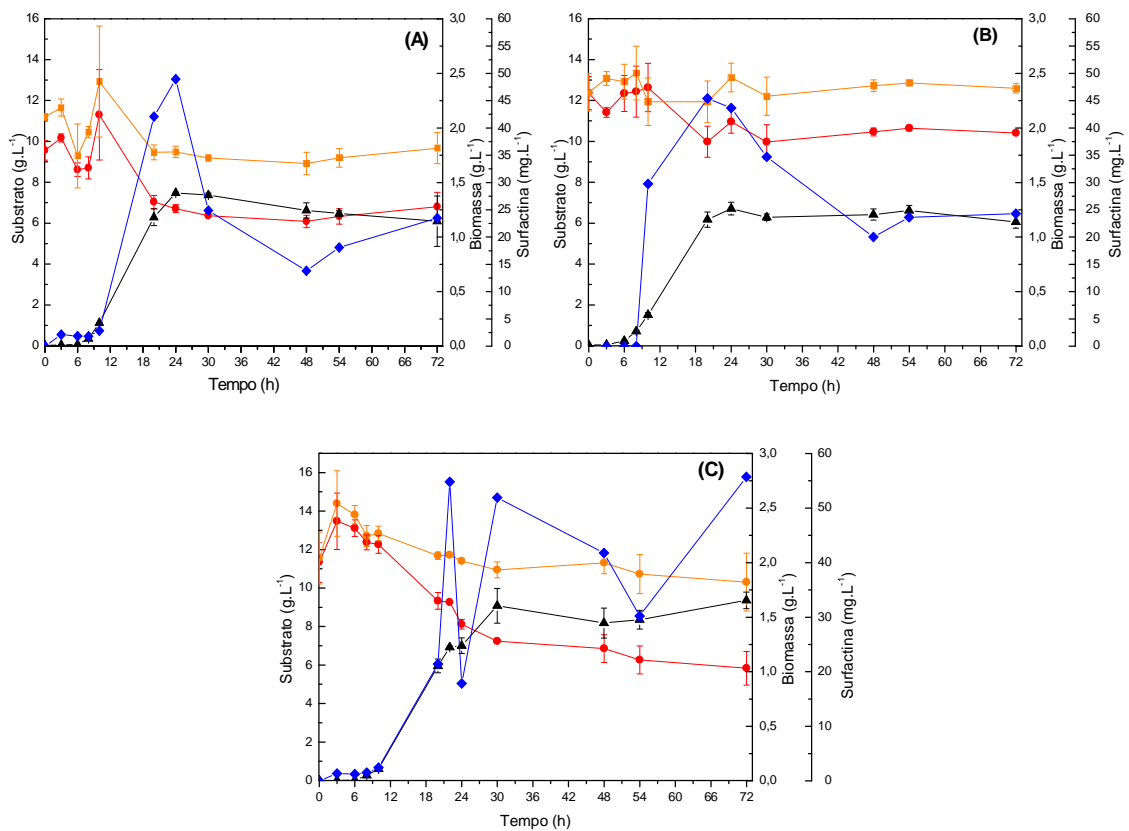


Figura 10 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) e variação de (NH₄)₂SO₄; (A) 0,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; (B) 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; (C) 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Concentrações iniciais de ART de ± 20,0 g.L⁻¹. (▲) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (■) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

Pode-se observar na Figura 10 (A, B e C) que embora o microrganismo consuma tanto glicose como frutose, apresentou visível preferência por glicose, fato observado por Oliveira *et al.*, (2011) em uma das condições estudadas quando avaliou diferentes meios de cultivo para produção de biossurfactantes. Observa-se ainda que não houve completo consumo de substrato, o que pode ser justificado devido o suco de caju clarificado ser um

substrato rico em vitaminas e minerais, e assim o microrganismo consome os demais nutrientes concomitantemente aos substratos presentes no suco. O ensaio com concentração inicial de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi o que apresentou maior concentração de biomassa, em torno de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ bem como de biossurfactante com concentrações de $55,71 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$. Os demais ensaios, utilizando concentrações de $0,5$ e $1,0 \text{ .L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram resultados semelhantes para crescimento celular e formação de produto, com concentrações em torno de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactante. Segundo Banat (1995), a fonte de nitrogênio é um dos fatores que exercem grande influência na produção de biossurfactantes, contribuindo para um bom rendimento no final do processo.

Diversos estudos foram realizados para definir a melhor relação entre o carbono, nitrogênio, fósforo e ferro necessária para a obtenção de alta produção e bons rendimentos (ABOUSEOUD *et al.*, 2008). Dentre a gama de biossurfactantes conhecidos, seu tipo, quantidade e qualidade são influenciados pelo microrganismo produtor, pela natureza do substrato disponível, pela concentração de íons com nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio e pelas demais condições de cultura, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (BANAT, 1995).

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos de tensão superficial para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de $0,5$, $1,0$ e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e com concentração inicial de ART de $\approx 20,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Pode-se observar na Tabela 9 que houve boa redução da tensão superficial em todos os ensaios. Para que aconteçam significativas reduções de tensão superficial necessita-se apenas da quantidade mínima de surfactante no meio, atingindo-se assim a concentração micelar crítica (CMC). Quando há o aumento da concentração de surfactante no meio, a tensão superficial diminui, ocorrendo a formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (MULLIGAN, 2005; PIRÔLLO, 2006; RUFINO, 2006).

Tabela 9 - Resultados obtidos de tensão superficial para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e com concentração inicial de ART de ± 20,0 g.L⁻¹.

Tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	0,5 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄
	Tensão Superficial (TS)	Tensão Superficial (TS)	Tensão Superficial (TS)
	Mn/m	mN/m	mN/m
MC	52,12 ± 0,2	56,07 ± 0,1	53,00 ± 0,1
0	50,00 ± 0,0	55,12 ± 0,2	52,08 ± 0,1
3	49,03 ± 0,1	50,08 ± 0,2	50,03 ± 0,1
6	49,03 ± 0,1	50,10 ± 0,1	38,03 ± 0,1
8	47,12 ± 0,2	35,00 ± 0,0	38,03 ± 0,1
10	34,90 ± 0,1	30,00 ± 0,0	36,00 ± 0,0
20	31,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0
24	31,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0	30,03 ± 0,0
30	31,03 ± 0,1	30,25 ± 0,3	30,00 ± 0,0
48	31,00 ± 0,0	29,80 ± 0,3	30,00 ± 0,0
54	31,00 ± 0,0	29,25 ± 0,3	30,00 ± 0,0
72	31,10 ± 0,1	29,00 ± 0,0	30,00 ± 0,0

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

A Figura 11 mostra a conversão de substrato para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ com concentração inicial de ART de ≈ 20,0 g.L⁻¹.

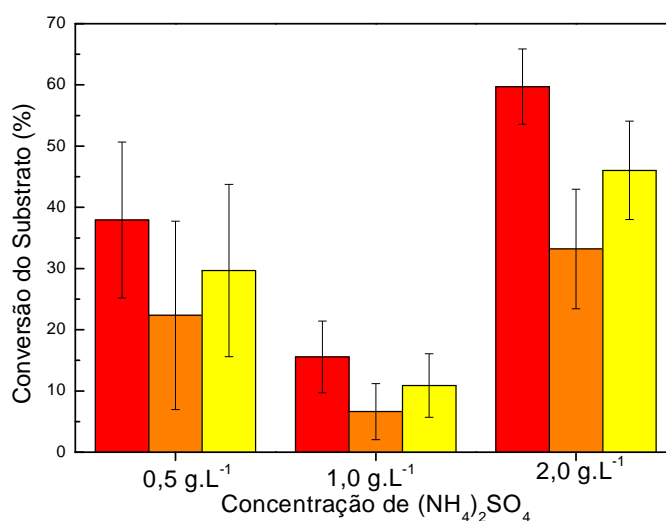


Figura 11 - Perfil apresentado para conversão de substrato para ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio de 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹ e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. (■) Glicose; (■) Frutose; (■) Açúcares Redutores Totais (ART).

De acordo com a Figura 11, verifica-se que o ensaio em que houve maior conversão de substrato foi com concentração de 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, condizente com a produção de surfactina e crescimento celular. Em testes realizados anteriormente por Oliveira (2010) e Oliveira *et al.*, (2013), o biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 é um metabólito primário, onde consumo de substrato, formação de produto estão associados ao crescimento celular.

A Tabela 10 apresenta os valores de pH obtidos para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio.

Durante os ensaios fermentativos para produção de biosurfactantes, observou-se queda de pH para até 4,0 em todas as condições estudadas. A acidificação indica que esta havendo produção, no entanto, surfactantes precipitam em pH ácido, sendo necessário ajustar o pH das amostras antes da remoção das células para 7,0 evitando perdas do produto e falhas nas análises a serem realizadas.

Tabela 10 - Resultados de pH obtidos para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e com concentração inicial de ART de ± 20,0 g.L⁻¹.

Tempo (h)	Ensaio 1 0,5 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄	Ensaio 2 1,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄	Ensaio 3 2,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄
MC	5,95 ± 0,01	6,15 ± 0,00	5,69 ± 0,00
0	5,91 ± 0,02	6,08 ± 0,01	5,65 ± 0,01
3	6,24 ± 0,01	6,17 ± 0,05	5,93 ± 0,01
6	6,44 ± 0,06	6,81 ± 0,03	6,08 ± 0,04
8	6,95 ± 0,10	6,42 ± 0,02	6,01 ± 0,05
10	6,80 ± 0,03	6,14 ± 0,01	4,95 ± 0,08
20	5,72 ± 0,02	5,75 ± 0,07	4,98 ± 0,08
24	5,98 ± 0,02	5,81 ± 0,01	4,76 ± 0,09
30	5,92 ± 0,06	5,69 ± 0,02	5,37 ± 0,31
48	5,43 ± 0,06	4,53 ± 0,05	4,11 ± 0,10
54	5,00 ± 0,07	4,38 ± 0,07	4,18 ± 0,06
72	4,34 ± 0,02	4,34 ± 0,03	4,35 ± 0,63

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

Realizaram-se ainda testes de emulsificação. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos. O surfactante produzido apresentou boa capacidade emulsificante utilizando n-

hexadecano e querosene para a concentração de 0,5 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄. Para a concentração de 1,0 g.L⁻¹, o melhor índice emulsificante foi utilizando óleo de soja e para a concentração de 2,0 g.L⁻¹ o melhor resultado foi com n-hexadecano. Tal fato pode ocorrer devido ao tipo de surfactante produzido, pois o mesmo vai depender de diversos fatores, como meio de cultivo e condições de produção. A variação da fonte de nitrogênio é um parâmetro que está intimamente ligado com o tipo de surfactante produzido.

Tabela 11 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação (IE) para os ensaios realizados variando a concentração da fonte de nitrogênio utilizando as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e com concentração inicial de ART de ± 20,0 g.L⁻¹.

Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ : 0,5 g.L ⁻¹			
Amostra	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	4,31 ± 0,01	47,41 ± 0,01	41,67 ± 0,35
48 h	14,46 ± 0,03	66,29 ± 0,02	41,15 ± 0,50
54 h	33,54 ± 0,30	56,41 ± 0,16	68,13 ± 0,12
72 h	33,80 ± 0,30	64,31 ± 0,06	67,24 ± 0,00
Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ : 1,0 g.L ⁻¹			
Amostra	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	52,10 ± 0,02	60,70 ± 0,07	NF
48 h	50,00 ± 0,00	NF	4,5 ± 0,01
54 h	51,90 ± 0,00	NF	16,44 ± 0,23
72 h	51,04 ± 0,01	4,13 ± 0,06	18,00 ± 0,25
Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ : 2,0 g.L ⁻¹			
Amostra	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
24 h	6,76 ± 0,01	5,70 ± 0,03	50 ± 0,00
30 h	7,36 ± 0,00	3,52 ± 0,00	51 ± 0,04
48 h	7,36 ± 0,00	5,87 ± 0,03	43,48 ± 0,01
54 h	12,05 ± 0,01	7,44 ± 0,00	39,77 ± 0,05
72 h	6,14 ± 0,03	8,03 ± 0,00	48,36 ± 0,05

De acordo com os resultados descritos, verifica-se que o biossurfactante produzido no meio de cultivo contendo suco de caju clarificado como fonte de carbono variando a concentração da fonte de nitrogênio de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para até 29,0 ± 0,0 mN/m. A maior concentração de biossurfactante obtida foi no ensaio com concentração de (NH₄)₂SO₄ obtendo-se valores em torno de 60 mg.L⁻¹. Diante dos resultados, para o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, a limitação de fonte de nitrogênio não favoreceu a produção. Verificou-se que concentrações mais elevadas de (NH₄)₂SO₄ apresentaram melhores

resultados, constatando assim que a concentração da fonte de nitrogênio é um importante parâmetro a ser estudado na produção de biossurfactantes, objetivando boa produtividade associada a bons rendimentos, no entanto, mais estudos são necessários para obter-se resultados mais significativos.

5.1.4. Uso de Nitrato de Amônio (NH_4NO_3) como Fonte de Nitrogênio

Frequentemente utiliza-se como fontes de nitrogênio sais de amônio como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. No intuito de otimizar a produção e alcançar maiores concentrações de produto, resolveu-se testar uma fonte de nitrogênio distinta, optando por nitrato de amônio (NH_4NO_3) na mesma concentração que se utilizava sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Como meio de cultivo utilizou-se suco de caju clarificado com concentração inicial de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ suplementado com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A Figura 12 apresenta os resultados de biomassa, formação de produto e consumo de substrato para o ensaio realizado.

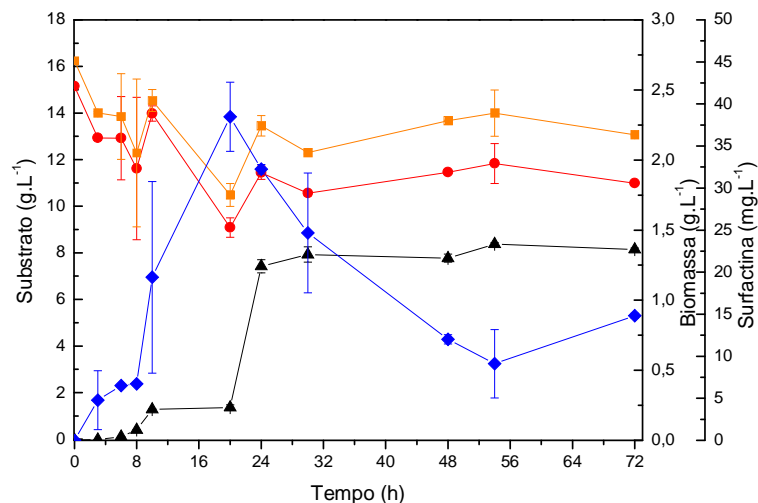


Figura 12 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) como e NH_4NO_3 . Concentrações iniciais de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$. (▲) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (■) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

Observa-se pela Figura 12, duas fases de adaptação do microrganismo. O fato justifica-se pela falta de energia que ocorreu durante o experimento, deixando as células por

um período de aproximadamente uma hora sem agitação, diminuindo assim a aeração e causando stress ao microrganismo. Observa-se que o crescimento celular apresenta-se na faixa estacionária a partir de 24 horas. A média de concentração celular de 24 a 72 horas é em torno de $1,33 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$. Houve baixo consumo de substrato, aproximadamente 21,4% de consumo de glicose ao final do experimento e 11% de consumo de frutose. Fato semelhante ocorreu ao utilizar sulfato de amônio para avaliar a influência da concentração, onde observou-se maior consumo do substrato quando utilizou-se concentrações de 0,5 e 2,0 g.L^{-1} de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, havendo maior formação de produto ao utilizar 2,0 g.L^{-1} de sulfato de amônio, obtendo concentração de $47,70 \pm 5,71 \text{ mg.L}^{-1}$. Optou-se por utilizar 1,0 g.L^{-1} nitrato de amônio devido não haver significativa diferença nas concentrações obtidas quando variou-se a concentração de sulfato de amônio (0,5 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 38,78 \pm 4,67 \text{ mg.L}^{-1}$; 1,0 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 47,70 \pm 5,71 \text{ mg.L}^{-1}$; 1,0 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 55,71 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$). No presente estudo, obteve-se concentração de surfactina de $38,47 \pm 4,11 \text{ mg.L}^{-1}$, inferior a concentração obtida quando utilizou-se a mesma concentração de sulfato de amônio (1,0 g.L^{-1}) como fonte de nitrogênio.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos de Tensão superficial (TS - mN/m) e pH para ensaio realizado utilizando suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ART) como fonte de carbono e 1,0 g.L^{-1} de (NH_4NO_3) como fonte de nitrogênio.

Tabela 12 - Resultados obtidos de Tensão superficial (TS - mN/m) e pH em ensaio realizado para produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ART) como fonte de carbono e 1,0 g.L^{-1} de (NH_4NO_3) como fonte de nitrogênio.

Tempo (h)	TS (mN/m)	pH
MC	$56,97 \pm 0,52$	$6,20 \pm 0,03$
0	$54,55 \pm 0,12$	$6,14 \pm 0,03$
3	$51,50 \pm 0,55$	$6,19 \pm 0,07$
6	$52,25 \pm 0,27$	$6,68 \pm 0,03$
8	$42,00 \pm 1,10$	$6,97 \pm 0,13$
10	$29,00 \pm 0,00$	$6,48 \pm 0,04$
20	$29,50 \pm 0,55$	$6,60 \pm 0,14$
24	$29,80 \pm 0,33$	$6,16 \pm 0,06$
30	$29,50 \pm 0,55$	$5,55 \pm 0,50$
48	$29,50 \pm 0,55$	$4,39 \pm 0,13$
54	$30,50 \pm 0,55$	$4,28 \pm 0,08$
72	$29,75 \pm 0,27$	$4,31 \pm 0,01$

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

Percebe-se significativa redução da tensão superficial, com redução de 48,20%, reduzindo de $56,97 \pm 0,52$ mN/m para uma média de $29,75 \pm 0,40$ mN/m.

A redução da tensão superficial é uma das primeiras análises realizadas para verificar se está havendo produção de biossurfactantes. Uma quantidade mínima presente no meio, desde que seja a concentração da CMC do surfactante produzido, é suficiente para obter valores de tensão superficial em torno de 30,0 mN/m. As concentrações obtidas de bioproduto, confirmam os resultados de tensão superficial obtidos, que indicaram presença de surfactante.

Avaliou-se o poder emulsionante do surfactante produzido frente a diferentes fontes hidrofóbicas: querosene, n-hexadecano e querosene. Adicionou-se 2,0 mL de caldo fermentado livre de células das amostras de diferentes tempos de cultivo e 2,0 mL de diferentes fonte hidrofóbicas. Agitou-se vigorosamente em vórtex por 2 minutos, deixando em repouso por 24 horas. Após esse período mediu-se a altura total da solução e a altura da fase emulsionada para obtenção do índice de emulsão (IE_{24}) em %. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos.

O meio contendo o surfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado como fonte de carbono e nitrato de amônio como fonte nitrogênio não foi capaz de emulsionar n-hexadecano e querosene. Observou-se certo poder emulsionante apenas com óleo de soja, no entanto, apesar dos valores em torno de 50%, as emulsões não apresentavam aparência firme.

Tabela 13 - Resultados obtidos de Índice de Emulsão (IE_{24}) em ensaio realizado para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0$ g.L⁻¹(ART) como fonte de carbono e 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄NO₃) como fonte de nitrogênio.

Amostra	N-HEXADECANO	QUEROSENE	ÓLEO DE SOJA
30h	NF	$60,69 \pm 6,64$	$52,10 \pm 1,75$
48h	$4,50 \pm 0,71$	NF	$50,00 \pm 0,00$
54h	NF	NF	$51,89 \pm 0,15$
72h	NF	NF	$51,04 \pm 1,48$

5.1.5. Influência da Temperatura

Com o objetivo de melhorar os rendimentos e condições de operação para produção de biossurfactantes, resolveu-se estudar a influência da temperatura (28°C, 32°C e 34°C) na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado (CAJC) como fonte de carbono com concentração inicial de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, por 72 horas. A Figura 13, apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005.

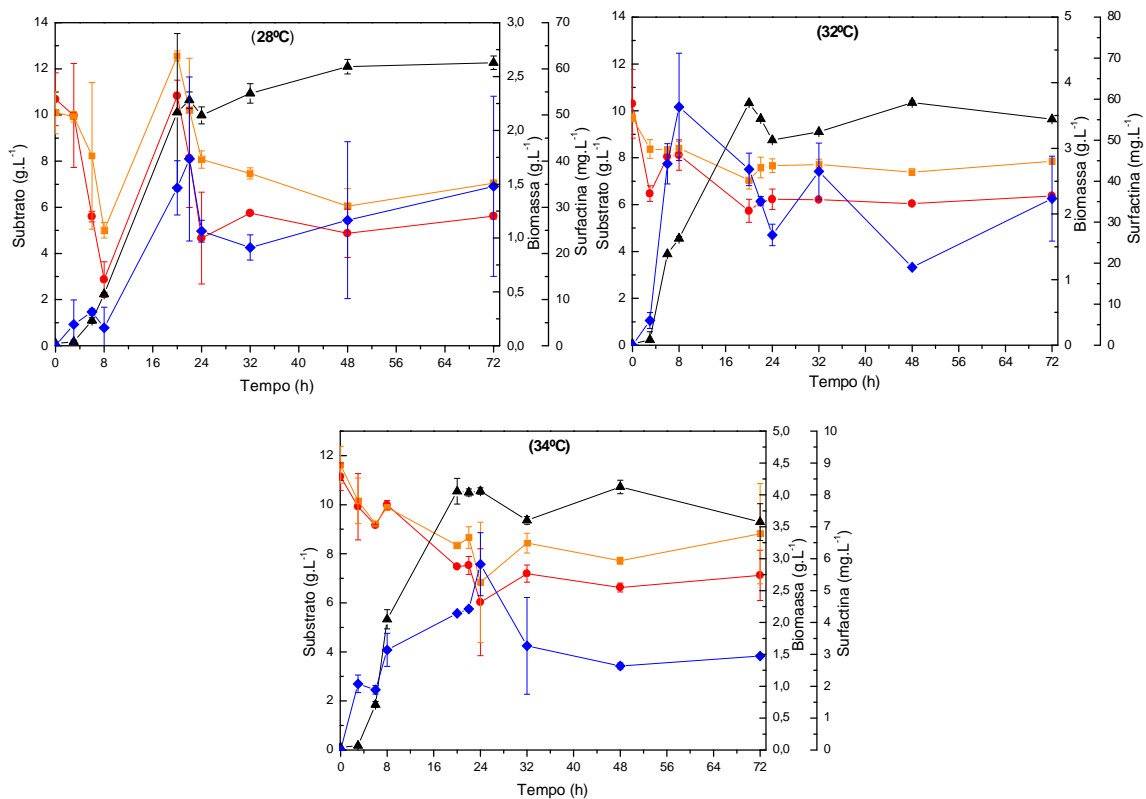


Figura 13 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 variando a temperatura em 28°C, 32°C e 34°C, cultivado em meio com suco de caju clarificado (CAJC) como fonte de carbono e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, por 72 horas. Concentrações iniciais de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$. (▲) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (■) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

Observa-se na Figura 13 que o ensaio onde obteve-se maior produção de surfactante foi a temperatura de 32°C, com concentração máxima de $58,10 \pm 13,09 \text{ mg.L}^{-1}$ que reduziu para $35,75 \pm 10,35 \text{ mg.L}^{-1}$ ao final do processo (72 horas).

Diversos fatores podem influenciar diretamente na estrutura e atividade dos biossurfactantes dentre os quais podem ser citados a fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura, pH, salinidade, entre outros (FERNANDES, 2007). A temperatura é um fator determinante nas velocidades das reações químicas e propriedades das biomoléculas, sendo assim, um parâmetro de estudo para delimitar uma faixa para o crescimento dos microrganismos. Esse parâmetro é relacionado à capacidade de sintetizar constituintes celulares com uma estabilidade maior ou menor ao calor (ESMERALDO, 2010).

Khopade *et al.*, (2012), em trabalho realizado de estudos da produção e estabilidade do biossurfactante isolado de ambiente marinho *Nocardiopsis sp.* B4 observou que a melhor condição de operação para obtenção do biossurfactante foi pH 7,0, temperatura 30°C e concentração de sal 3%. A produção foi realizada utilizando azeite de oliva como fonte de carbono e fenil alanina como fonte de nitrogênio. Observou ainda que a produção do biossurfactante foi dependente do crescimento.

Faria (2010), ao estudar a Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual bruta como substrato orgânico, avaliou 19 linhagens de *Bacillus sp.* e selecionou o microrganismo *Bacillus subtilis* LSFM_05 para realização dos testes e designou como condições ótimas para a produção, através do planejamento experimental, a temperatura de 32°C e concentração de glicerina de 5% v/v.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos de tensão superficial para os ensaios realizados variando a temperatura em 28°C, 32°C e 34°C. Os ensaios foram conduzidos em duplicata e as amostras foram medidas a temperatura ambiente, em triplicata.

Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 14, que no ensaio na temperatura de 32°C a tensão superficial reduz para $30,97 \pm 0,08$ em 06 horas de ensaio. A redução da tensão superficial é indício de que há surfactante no meio fermentado, pois a redução da tensão superficial do meio está relacionada à sua presença bem como à qualidade do surfactante obtido (BUENO, 2010). Observou-se uma maior redução no ensaio com temperatura de 32°C chegando a $29,08 \pm 0,01$ mN/m, porém o ensaio realizado a 28°C e 34°C também apresentaram bons valores de redução da tensão superficial, entre 33 e 30 mN/m. Como houve produção em todas as condições estudadas (28, 32 e 34°C), de acordo com os resultados de tensão superficial, as concentrações de bioproduto obtidas foram suficientes para alcançar a concentração micelar crítica (CMC), o que ocorre quando há presença de uma quantidade mínima de biotensioativo no meio para que ocorrendo assim a redução da tensão

superficial. A produção de moléculas com atividade de redução da tensão superficial ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso, o que impede a sua oxidação e assimilação (COLLA & COSTA, 2003).

Tabela 14 - Resultados obtidos de tensão superficial para os ensaios realizados variando a temperatura em 28°C, 32°C e 34°C em meio de cultivo contendo suco de caju clarificado com concentração com inicial de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, por 72 horas.

Tempo (h)	Ensaio 1 28°C	Ensaio 2 32°C	Ensaio 3 34°C
MC	58,5 \pm 1,64	57,13 \pm 0,11	63,98 \pm 0,31
0	59,92 \pm 0,74	48,15 \pm 0,05	61,63 \pm 0,52
3	49,67 \pm 0,45	49,67 \pm 0,06	61,22 \pm 0,12
6	46,00 \pm 0,32	30,97 \pm 0,08	37,60 \pm 0,57
8	34,18 \pm 0,29	30,83 \pm 0,20	33,50 \pm 0,00
20	30,72 \pm 0,28	30,22 \pm 0,08	32,75 \pm 0,35
22	30,85 \pm 0,10	29,08 \pm 0,01	31,75 \pm 0,35
24	31,87 \pm 0,31	29,63 \pm 0,14	32,00 \pm 0,00
32	32,32 \pm 0,26	29,83 \pm 0,20	31,00 \pm 0,00
48	32,58 \pm 0,31	30,10 \pm 0,19	31,75 \pm 0,35
72	32,12 \pm 0,21	30,00 \pm 0,00	30,00 \pm 1,41

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

A Tabela 15 apresenta os resultados de pH obtidos para os ensaios realizados variando a temperatura em 28°C, 32°C e 34°C em meio de cultivo contendo suco de caju clarificado com concentração com inicial de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, por 72 horas.

Observa-se pelos resultados obtidos em todas as condições estudadas que o pH do meio fermentado foi reduzindo ao longo do tempo, chegando a valores de até $4,35 \pm 0,01$ a 32°C, temperatura onde houve maior produção de biossurfactantes. A diminuição do pH aconteceu em todos os experimentos realizados com a linhagem *Bacillus subtilis* LAMI005. Sabe-se que o microrganismo excreta outros produtos, não só biossurfactante. Acredita-se que a diminuição do pH se dê a diversidade de metabólitos excretados.

Tabela 15 - Resultados de pH obtidos para os ensaios realizados variando a temperatura em 28°C, 32°C e 34°C em meio de cultivo contendo suco de caju clarificado com concentração com inicial de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, por 72 horas.

Tempo (h)	Ensaio 1 28°C	Ensaio 2 32°C	Ensaio 3 34°C
Branco	6,19 \pm 0,04	6,19 \pm 0,00	6,19 \pm 0,04
0	6,28 \pm 0,11	6,25 \pm 0,00	6,08 \pm 0,01
3	6,46 \pm 0,00	6,58 \pm 0,06	6,70 \pm 0,01
6	6,52 \pm 0,03	6,18 \pm 0,05	6,06 \pm 0,04
8	5,76 \pm 0,01	5,92 \pm 0,06	6,07 \pm 0,02
20	5,49 \pm 0,00	6,19 \pm 0,06	6,15 \pm 0,05
22	5,30 \pm 0,00	6,08 \pm 0,02	6,28 \pm 0,08
24	5,42 \pm 0,04	5,54 \pm 0,08	6,23 \pm 0,01
32	4,73 \pm 0,01	4,53 \pm 0,04	4,86 \pm 0,04
48	4,78 \pm 0,04	4,44 \pm 0,04	4,36 \pm 0,02
72	4,72 \pm 0,04	4,35 \pm 0,01	5,12 \pm 1,05

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

5.1.6. Caracterização em FTIR do Biosurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos da análise em Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR).

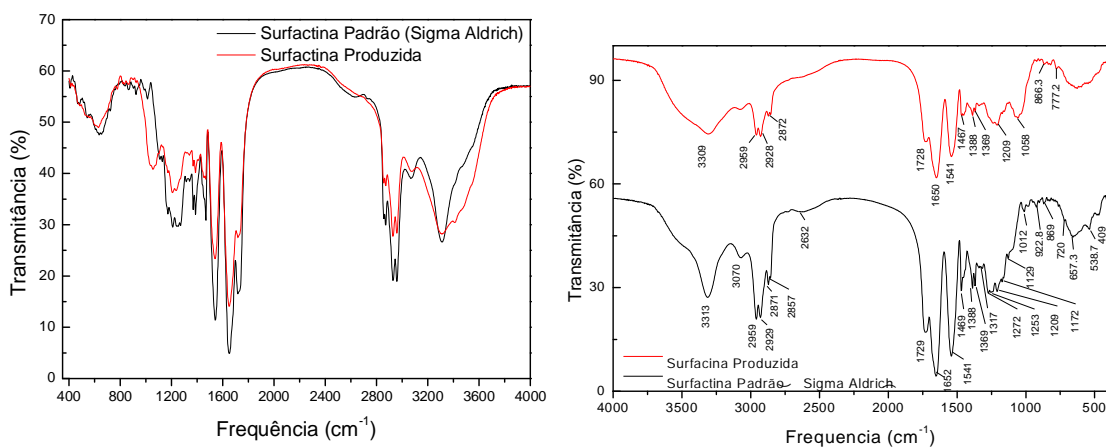


Figura 14 - FTIR - espectrogramas vibracionais na região do infravermelho para surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina purificada produzida extracelularmente a partir da cultura de *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivada em suco de caju clarificado (CAJC) + sulfato de amônio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) em $\approx 60 \text{ g.L}^{-1}$ de ART, 30°C e 180 rpm.

Observa-se na Figura 14, os espectros vibracionais na região do infravermelho (FTIR) obtidos de amostras do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 e da surfactina padrão (Sigma Aldrich, 95% de pureza). É possível observar nos espectros características de peptídeos, nas quais as bandas identificadas indicam as seguintes ligações: 3430: NH, 1655: CO, 1534:CN e canais alifáticos (3000-2800, CH₂ e CH₃), indicando que esse composto é um lipopeptídeo. Também foi observada uma banda correspondente ao grupo carbonil ester (1730:CO). Observou-se resultados similares por Lin *et al.* (1994), quando determinou a estrutura química do surfactante produzido por *Bacillus licheniformis*. Não foi observada diferença significativa entre os espectros IR da surfactina semipurificada produzida extracelularmente a partir da cultura de *Bacillus subtilis* LAMI005e surfactina padrão (Sigma Aldrich) no presente estudo. Os mesmos se sobrepõem bem, indicando que o produto obtido no processo fermentativo é um lipopeptídeo do tipo surfactina.

5.1.7. Perda da Capacidade de Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005

Ao longo de todos os experimentos, observou-se uma baixa produção de biossurfactante por parte do microrganismo estudado. Com a finalidade de confirmar esse indício, resolveu-se realizar um ensaio de acordo com Oliveira (2010). A Tabela 16, apresenta os resultados de tensão superficial e pH obtidos no ensaio realizado.

Acredita-se que o microrganismo perdeu seu potencial de produção, visto que estudos anteriores mostraram boa produtividade. Observa-se que houve redução da tensão superficial, indício de formação de produto. A literatura relata que um organismo é considerado promissor produtor de biossurfactante quando produz compostos tensoativos capazes de reduzir significativamente a tensão superficial do meio, para valores inferiores a 40 mN/m, no entanto, para o biossurfactante ser considerado eficiente é necessário que este valor esteja abaixo de 35 mN/m (DECESARO *et al.*, 2013). A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes, que é a medida de sua eficiência varia entre 1 - 2000 mg/L (BOGNOLO, 1999). Oliveira (2010) encontrou valores de CMC de 10 a 65 mg/L ao estudar diferentes concentrações de fonte de carbono com o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, justificando os baixos valores de tensão superficial, ou seja, embora haja baixa produção, a concentração excretada presente no meio está na CMC, concentração mínima de

biotensoativo que se inicia a formação de micelas, fato diretamente ligado a redução da tensão superficial.

Tabela 16 - Resultados obtidos de Tensão superficial (TS - mN/m) e pH em ensaio realizado para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado com concentração de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ART) como fonte de carbono $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, 30°C, por 72 horas.

Tempo	TS (mN/m)	pH
MC	56,97 \pm 0,52	6,63 \pm 0,05
0	54,55 \pm 0,12	6,63 \pm 0,03
3	53,70 \pm 0,80	6,57 \pm 0,06
6	51,83 \pm 0,52	6,71 \pm 0,01
8	38,12 \pm 0,20	6,73 \pm 0,03
10	29,07 \pm 0,05	6,32 \pm 0,01
20	29,00 \pm 0,00	6,04 \pm 0,02
24	29,33 \pm 0,26	5,61 \pm 0,03
30	29,25 \pm 0,27	5,20 \pm 0,07
48	29,72 \pm 0,13	4,32 \pm 0,03
54	29,35 \pm 0,40	4,22 \pm 0,05
72	29,57 \pm 0,12	4,18 \pm 0,02

MC: Meio de Cultivo sem do inóculo (Branco)

A Figura 15 apresenta os resultados obtidos com a finalidade de avaliar o índice de perda do potencial de produção de biossurfactantes pelo microrganismo *Bacillus Subtilis* LAMI005.

Observa-se na Figura 15 que houve baixo consumo de substrato bem como de crescimento celular. A concentração de biomassa máxima foi de apenas $1,07 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$. Fato que não ocorria em estudos anteriores com a mesma cepa. A maior concentração de bioproduto obtida foi de $31,32 \text{ mg.L}^{-1}$. Oliveira (2010) ao realizar ensaios utilizando suco de caju clarificado com concentração inicial de ART de $22,92 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, obteve concentração de biomassa e de surfactina de $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ e $372,56 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Oliveira *et al.* (2013) chegou a obter $319,32 \text{ g.L}^{-1}$ de bioproduto ao utilizar suco de caju clarificado com concentração inicial de ART de $96,10 \text{ g.L}^{-1}$. Giro *et al.* (2009) chegou a obter 125 mg.L^{-1} de surfactina ao utilizar meio mineral de acordo com Mórán *et al.* (2000) adicionando suco de caju clarificado como fonte de carbono, utilizando a mesma cepa aqui estudada.

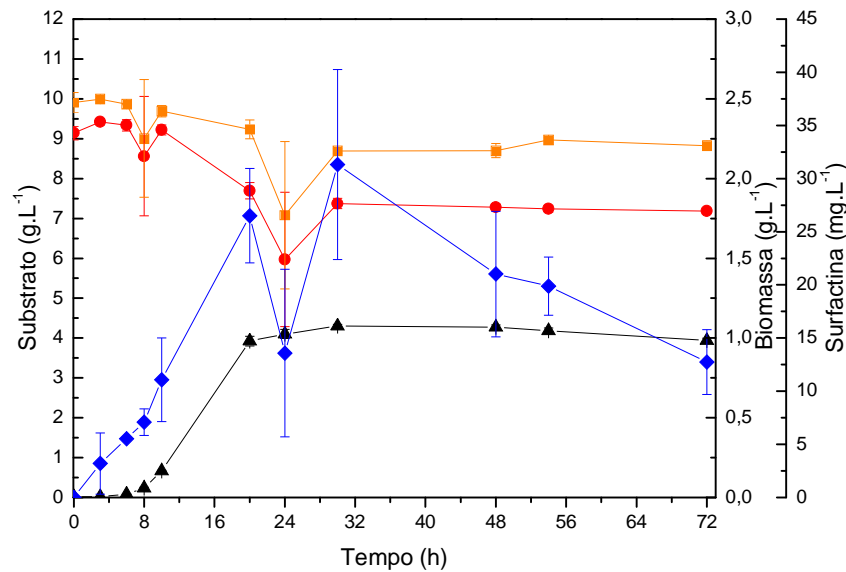


Figura 15 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* LAMI005 cultivado em meio com suco de caju clarificado (CAJC) como fonte de carbono e 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio, a 180 rpm, 30°C, por 72 horas. Concentrações iniciais de ART de ± 20,0 g.L⁻¹. (▲) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (■) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

5.2. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por Linhagens Isoladas de Solos de Manguezais do Estado do Ceará: Jag248 e Jag249, isoladas do Rio Jaguaribe e ICA12, ICA24, e ICA56, isoladas de Icapuí

5.2.1. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por *Bacillus sp. Jag248*

Avaliou-se o potencial de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* Jag248, variando os meios de cultivo, buscando uma possível identificação das condições ótimas de produção. Os meios de cultivo avaliados foram: (A) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + Extrato de Levedura; (B) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + (Na₂HPO₄); (C) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + (KH₂PO₄); (D) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + (NaCl); (E) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + MgSO₄.7H₂O; (F) Meio Mineral + suco de caju clarificado + Solução de Micronutrientes, conforme descritos em 4.2.3. Em tais ensaios, analisaram-se concentração de biomassa, produção de biossurfactantes tensão superficial e índice de emulsificação.

A Tabela 17 apresenta o perfil do crescimento celular (biomassa), produção de surfactina e pH variando os meio de cultivo.

Tabela 17 - Resultados de concentração de biomassa, formação de produto e pH para os ensaios realizados utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 variando a composição dos meios de cultivo.

Meios de cultivo	Concentração de Biomassa (g/L)		Surfactina (mg/L)	pH	
	0h	48 horas	48 horas	0h	48 horas
A	0,001	1,398 ± 0,101	7,72 ± 0,05	6,42	6,61 ± 0,45
B	0,001	0,995 ± 0,093	18,58 ± 3,77	7,07	6,46 ± 0,09
C	0,006	1,263 ± 0,019	11,38 ± 1,04	6,81	5,81 ± 0,01
D	0,002	0,529 ± 0,026	11,43 ± 3,50	6,50	5,93 ± 0,03
E	0,003	0,524 ± 0,015	10,92 ± 1,18	6,31	5,58 ± 0,04
F	0,008	2,066 ± 0,155	44,03 ± 3,17	6,85	6,70 ± 0,04

O meio de cultivo F foi o que mais chamou atenção, chegando a concentração de $2,07 \pm 0,16$ g/L e produção de surfatina $44,03 \pm 3,17$, superior aos outros meios de cultivo testados, entretanto, foi inferior quando comparado com França *et al.* (2011), que obteve uma produção em torno de 123 mg.L^{-1} em meio mineral suplementado com suco de caju e 232 mg.L^{-1} em meio mineral utilizando glicose e frutose P.A em ensaios realizados utilizando o microrganismo *Bacillus sp.* LAMI005. A fermentação com o Meio (A), (B) e (C), apresentaram biomassa $1,4 \pm 0,1$ g/L, $0,99 \pm 0,1$ g/L e $1,26 \pm 0,02$ g/L respectivamente. O ensaio com meio (D) e (E) obtiveram resultados muito semelhantes, obtendo as menores concentrações celulares: $0,52 \pm 0,03$ g/L e $0,52 \pm 0,02$ g/L para D e E, respectivamente, e produção de surfactina $11,43 \pm 3,50$ mg/L para D e $10,92 \pm 1,18$ mg/L para E.

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos de índice de emulsificação dos meios fermentados livre de células, realizados utilizando como fonte hidrofóbica óleo de soja, querosene e n-hexadecano.

O índice de emulsificação é um método analítico importante de avaliação do poder emulsificante do surfactante (BARROS, 2008). No estudo realizado observou-se os seguintes valores como melhores resultados: $66,38 \pm 0,6\%$ em querosene e $62,58 \pm 0,8\%$ em n-hexadecano para o ensaio (B) e $63,86 \pm 1,6\%$ em querosene e $63,27 \pm 5,86\%$ em n-hexadecano para o ensaio (D). Bezerra *et al.* (2012), utilizando *Pseudomonas aeruginosa*

(P.A.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato obteve índice de emulsificação variando de 50 a 68%, valores semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Tabela 18 - Resultados de índice de emulsificação dos meios fermentados livre de células para os ensaios realizados utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 variando a composição dos meios de cultivo.

Índice de Emulsificação (IE₂₄ %)			
Amostra	Óleo de soja	Querosene	N-hexadecano
A - 48h	8,70 ± 6,15	11, 22 ± 8,66	22,73 ± 6,43
B - 48h	3,82 ± 0,26	66,38 ± 0,58	62,58 ± 0,78
C - 48h	NF	NF	4,68 ± 2,22
D - 48h	NF	63,86 ± 1,57	63, 27 ± 5,86
E - 48h	NF	NF	19,23 ± 7,97
F - 48h	40,16 ± 15,16	23,73 ± 9,68	24,59 ± 9,87

NF - não formou emulsão

Observa-se na Tabela 19 os resultados obtidos de tensão superficial dos meios fermentados livre de células dos ensaios realizados variando os meios de cultivo.

Tabela 19 - Resultados de tensão superficial dos meios fermentados livre de células para os ensaios realizados utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 variando a composição dos meios de cultivo.

Meios de cultivo	Tensão Superficial (mN/m)	
	0 horas	48 horas
A	51,8 ± 0,29	33,5 ± 0,55
B	54 ± 0,0	32 ± 0,0
C	50 ± 0,0	34,25 ± 0,27
D	54,3 ± 0,12	33,3 ± 0,55
E	51,2 ± 0,35	33,5 ± 0,55
F	52 ± 0,0	36,2 ± 0,26

A redução da tensão superficial, indicativo de produção de biossurfactante (NITSCHKE & PASTORE, 2002), ocorreu em todos os ensaios analisados. Nitschke & Pastore (2006) obteve uma redução da tensão superficial de 37% em relação ao ponto inicial, equivalente ao obtido nos ensaios realizados nesse estudo 35,3% para (A), 40,7% para (B), 31,4% para (C), 38,7% para (D), 34,6% para (E) e 30,4% para (F).

Os parâmetros analíticos dos ensaios realizados revelam a influência de diferentes nutrientes na produção de biossurfactante, avaliando a relação entre o crescimento celular, redução da tensão superficial, poder emulsificante com a produção de surfactina.

A avaliação da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* Jag 248, em diferentes meios e cultivo contendo como principal fonte de carbono suco de caju clarificado (CAJC) adicionado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, foi relevante para investigar uma boa condição para produção de biossurfactantes pelo microrganismo estudado. A partir dos resultados obtidos acima, realizou-se estudo cinético utilizando os meios de cultivo contendo suco de Caju Clarificado (CAJC) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meio mineral (MM) adicionando solução de micronutrientes e Meio Mineral (MM) sem adição de solução de micronutrientes, sob rotação de 180 rpm, temperatura 30°C e pH inicial 7,0.

A Tabela 20 apresenta os resultados de tensão superficial e pH para o ensaio realizado em meio com suco de caju clarificado (CAJC) adicionado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio e solução de micronutrientes. Observou-se redução da tensão superficial do meio de cultivo livre de células, com valores de $29,10 \pm 0,12$ dina/cm após 10 horas de ensaio e manteve-se nessa faixa até 72 horas, conforme mostra Tabela 17. O pH manteve-se na faixa de 6,0 a 6,75.

Tabela 20 - Resultados obtidos de Tensão superficial (TS) e pH para os ensaios realizados para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) adicionado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentrações iniciais de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Tempo (h)	Tensão Superficial (mN/m)	pH
MC	$62,07 \pm 0,05$	$6,23 \pm 0,08$
0	$59,35 \pm 1,24$	$6,19 \pm 0,00$
3	$54,75 \pm 0,60$	$6,38 \pm 0,01$
6	$54,37 \pm 0,29$	$6,72 \pm 0,01$
8	$31,9 \pm 0,99$	$6,74 \pm 0,02$
10	$29,08 \pm 0,12$	$6,39 \pm 0,17$
20	$29,55 \pm 0,60$	$6,18 \pm 0,08$
24	$30,98 \pm 0,04$	$6,03 \pm 0,04$
30	$31,73 \pm 0,12$	$6,15 \pm 0,03$
48	$31,12 \pm 0,10$	$6,03 \pm 0,01$
54	$30,92 \pm 0,10$	$6,27 \pm 0,10$
72	$31,00 \pm 0,11$	$6,03 \pm 0,02$

MC: Meio de Cultivo sem inóculo (Branco)

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos em ensaios realizados utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 em Meio contendo Suco de Caju Clarificado (CAJC) suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.

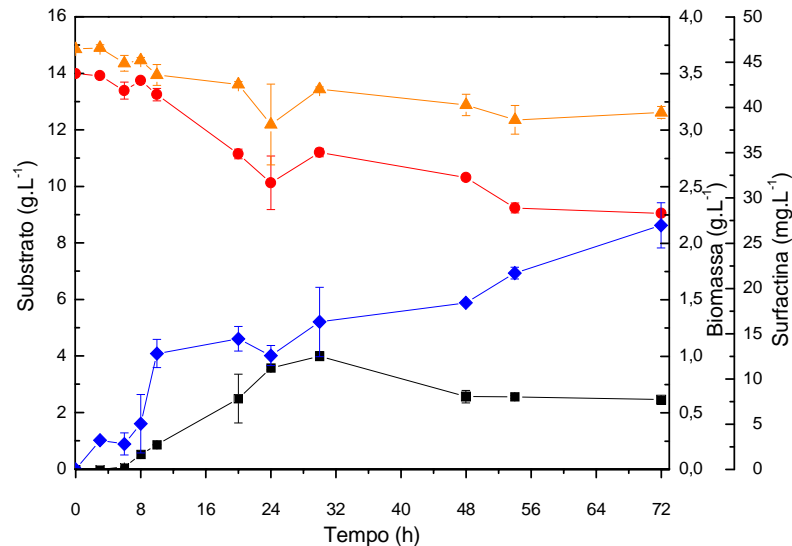


Figura 16 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) adicionado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30°C, 180 rpm. Concentrações iniciais de ART de $\pm 20,0 \text{ g.L}^{-1}$. (■) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (▲) Concentração de Frutose; (◆) Surfactina.

De acordo com a Figura 16, observa-se maior concentração de biomassa em torno de $1,00 \pm 0,04 \text{ g/L}$ após 30 horas de fermentação, uma crescente produção de biossurfactantes no decorrer das 72 horas chegando a concentração de $26,98 \pm 0,01 \text{ mg/L}$ de surfactina, concentração muito baixa. Ocorreu baixo consumo dos açúcares redutores totais (ART), no entanto observa-se que o microrganismo tem preferência por glicose.

A avaliação da capacidade emulsionante do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* Jag248 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) adicionando de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio pode ser observada na Tabela 21.

Observa-se pela Tabela 21, que houve formação de emulsão consideráveis apenas para querosene e n-hexadecano. Para a amostra de 30 horas de fermentação, obteve-se índice de emulsificação de $56,86 \pm 3,90$ e $36,28 \pm 23,03$ para querosene e n-hexadecano respectivamente. Para óleo de soja só obteve-se emulsão nas amostras de 48 horas, com IE_{24} de $21,30 \pm 0,00$.

Tabela 21 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE_{24}) para o ensaio realizado utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 em Meio contendo Suco de Caju Clarificado (CAJC) e $(NH_4)_2SO_4$.

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE_{24})			
AMOSTRA	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	NF	$56,86 \pm 3,90$	$36,28 \pm 23,03$
48 h	$21,30 \pm 0,00$	$05,92 \pm 2,94$	$21,81 \pm 19,54$
54 h	NF	$13,64 \pm 0,00$	$20,45 \pm 3,21$
72 h	NF	$06,31 \pm 1,61$	$34,57 \pm 0,13$

NF: Não formou emulsão

Seguiram-se os experimentos, e avaliou-se a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) adicionando solução de micronutrientes. A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos em ensaio realizado utilizando meio mineral com adição de micronutrientes.

Observa-se redução da tensão superficial em torno de 55%, com valores de até $28,50 \pm 0,00$ mN/m em 20 horas de ensaio. A tensão superficial manteve-se entre $28,50 \pm 0,00$ e $31,28 \pm 0,32$ de 20 até 72 horas de ensaio. Não houve acidificação do meio durante o ensaio fermentativo e o pH manteve-se entre 6,0 e 7,0.

Tabela 22 - Resultados obtidos de Tensão superficial (TS) e pH para os ensaios realizados para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes.

Tempo (h)	Tensão Superficial (mN/m)	pH
MC	$62,07 \pm 0,05$	$6,23 \pm 0,08$
0	$48,32 \pm 0,21$	$6,83 \pm 0,01$
3	$47,02 \pm 0,04$	$6,86 \pm 0,03$
6	$38,08 \pm 0,20$	$6,93 \pm 0,00$
8	$33,50 \pm 0,00$	$6,87 \pm 0,01$
10	$29,25 \pm 0,82$	$6,76 \pm 0,02$
20	$28,50 \pm 0,00$	$6,57 \pm 0,10$
24	$29,25 \pm 0,27$	$6,13 \pm 0,13$
30	$29,23 \pm 0,77$	$6,18 \pm 0,06$
48	$30,40 \pm 0,44$	$6,29 \pm 0,21$
54	$29,12 \pm 0,90$	$6,74 \pm 0,10$
72	$31,28 \pm 0,32$	$6,69 \pm 0,15$

MC: Meio de Cultivo sem inóculo (Branco)

A Figura 17 apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes.

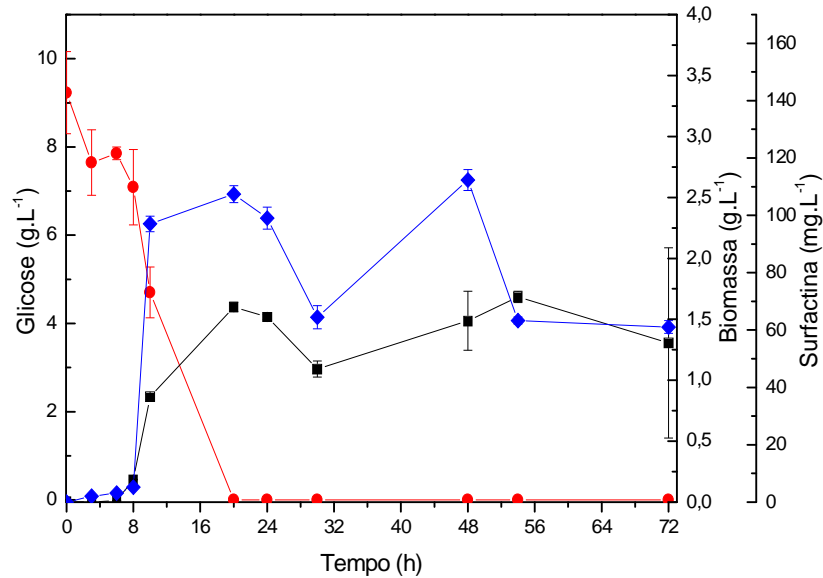


Figura 17 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes, 30°C, 180 rpm. (■) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (◆) Surfactina.

Observa-se na Figura 17 consumo total do substrato com 20 horas de ensaio, maior concentração de biomassa com 54 horas com concentração de $1,69 \pm 0,05$ mg/L. A maior concentração de surfactina obtida foi com 48 horas de ensaio, chegando a 112,31 mg/L.

A Tabela 23 apresenta os resultados do poder emulsionante do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* Jag248.

Tabela 23 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE₂₄) para o ensaio realizado utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes.

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE ₂₄)			
AMOSTRA	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	14,00 ± 2,83	5,77 ± 2,72	15,96 ± 5,71
48 h	19,10 ± 3,11	5,79 ± 3,13	26,00 ± 2,83
54 h	20,31 ± 5,95	12,44 ± 2,67	11,07 ± 6,23
72 h	22,63 ± 6,57	4,36 ± 0,00	25,90 ± 1,56

Observa-se pela Tabela 23, que não houve boa formação de emulsão. Com nenhuma das fontes hidrofóbicas testadas obteve-se IE₂₄ de pelo menos 50%. A maior emulsão obtida foi de 26,00 ± 2,83 utilizando n-hexadecano.

Realizou-se ensaio para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* Jag248 utilizando meio mineral (MM) sem adição de solução de micronutrientes. A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos de tensão superficial e pH nas condições estudadas. Verifica-se ao avaliar a Tabela 24 que o pH manteve-se acima de 6,0 e redução da tensão superficial de 51,0 ± 0,0 mN/m (Branco) para 28,65 ± 0,16 mN/m após dez horas de ensaio e permanecendo nessa faixa em todas as amostras avaliadas até 72 horas de ensaio.

Tabela 24 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação % (IE₂₄) para o ensaio realizado utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) sem adição de solução de micronutrientes.

Tempo (h)	Tensão Superficial (mN/m)	pH
MC	52,75 ± 0,82	6,80 ± 0,01
0	51,00 ± 0,00	6,56 ± 0,05
3	43,25 ± 0,27	6,57 ± 0,10
6	42,00 ± 0,00	6,68 ± 0,01
8	29,50 ± 0,00	6,47 ± 0,17
10	28,65 ± 0,16	6,15 ± 0,07
20	29,50 ± 0,44	5,98 ± 0,11
24	30,00 ± 0,00	6,03 ± 0,01
30	30,50 ± 0,00	6,04 ± 0,01
48	31,75 ± 0,27	6,67 ± 0,25
54	31,50 ± 0,55	6,84 ± 0,11
72	31,25 ± 0,27	6,60 ± 0,34

MC: Meio de Cultivo sem inóculo (Branco)

A Figura 18 apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) sem adição de solução de micronutrientes.

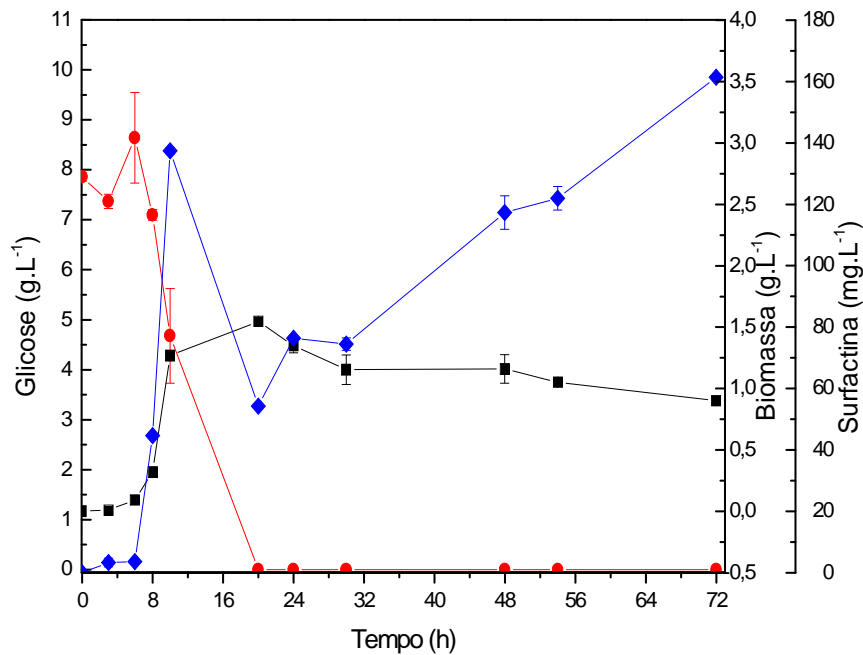


Figura 18 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) sem adição de solução de micronutrientes, 30°C, 180 rpm. (■) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (◆) Surfactina.

Observa-se pela Figura 18 maior concentração de surfactina e crescimento celular quando comparado ao ensaio com suco de Caju Clarificado (CAJC) + (NH₄)₂SO₄ + solução de micronutrientes apresentando concentração de biomassa de 1,55 ± 0,01 g/L após 20 horas de ensaio e logo mantendo-se na fase estacionária. A produção de surfactina chegou a atingir concentrações de 161,41 ± 0,01 mg/L no decorrer de 72 h de ensaio e a glicose foi totalmente consumida nas primeiras 20 horas de fermentação. Dos ensaios realizados, este foi o que apresentou melhores resultados. A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos para índice de emulsificação das amostras do ensaio para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag248 em meio mineral (MM) sem adição de solução de micronutrientes.

Tabela 25 - Resultados obtidos de Índice de Emulsificação para o ensaio realizado utilizando *Bacillus subtilis* Jag248 em Meio Mineral (MM) sem adição de Solução Micronutrientes.

AMOSTRA	ÓLEO DE SOJA	QUEROSENE	N-HEXADECANO
30 h	57,00 ± 11,41	07,02 ± 0,17	09,64 ± 1,00
48 h	53,16 ± 14,60	16,00 ± 5,66	14,82 ± 0,25
54 h	52,00 ± 2,83	18,00 ± 2,83	13,89 ± 3,93
72 h	43,72 ± 11,32	56,26 ± 11,68	54,35 ± 14,63

O biossurfactante produzido por *Bacillus Subtilis* Jag248 nas condições estudadas citadas acima, foi capaz de emulsionar todas as fontes hidrofóbicas testadas. Nas amostras de 72 horas, onde obteve-se maior concentração de surfactantes, também obteve-se maior índice de emulsão, com valores de IE₂₄ de $43,72 \pm 11,32$ mN/m, $56,26 \pm 11,68$ mN/m e $54,35 \pm 14,63$ mN/m para óleo de soja, querosene e n-hexadecano respectivamente. Barreto (2011), ao estudar sobre prospecção ambiental de microrganismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes, verificou capacidade desemulsificante do biossurfactante produzido pela linhagem Jag248 ao realizar um teste adicionando 300 µL do sobrenadante bruto da cultura em uma emulsão estável formada por meio mineral, querosene e Tween 80, um tensoativo comercial utilizado como controle positivo para ensaios de emulsificação. O teste foi feito após observar uma camada de 100% de emulsão no ensaio E24, no entanto, a emulsão se desfez após 24 horas de repouso.

Em pesquisa de genes *sfp*, *ituD* e *Ipa14* realizados por Barreto (2011), o teste foi positivo para os genes de iturina *ituD* e *Ipa14* para Jag248. Em análises cromatográficas realizadas, detectamos picos com tempos de retenção semelhantes aos de surfactina padrão, por este motivo quantificamos como surfactina. Seria necessário uma caracterização mais específica para certificar se há excreção dos dois tipos de surfactante, surfactina e iturina, ou, se há produção de apenas um tipo. Como a pesquisa de genes *sfp* ligado a produção de surfactina foi positivo para Jag249, resolveu-se avaliar esta cepa.

5.2.2. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por *Bacillus sp.* Jag249

A Tabela 26 apresenta os resultados obtidos de concentração celular, pH e tensão superficial para avaliar a produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.* Jag249. Observa-se na Tabela 26 ao avaliar a 180 rpm, concentração celular de $5,43 \pm 1,61$ g/L em 72 horas de ensaio tendo o pH reduzido a até $4,99 \pm 0,04$. Não houve redução significativa da tensão superficial, permanecendo acima de 49,5 mN/m. Resultado semelhante acontece a 150 rpm, com crescimento celular de $5,06 \pm 2,09$ g/L, com redução do pH a $4,57 \pm 0,16$ e tensão superficial mínima de $52,75 \pm 0,82$ mN/m em 48 horas de ensaio. como não houve redução da tensão superficial a pelo menos 40 mN/m, não realizaram-se outras análises, como quantificação do biossurfactante produzido, uma vez que não havendo redução da tensão superficial, não há

indícios de produção. Resolveu-se avaliar diferentes meios de cultivo no intuito de obter uma condição que houvesse produção de biossurfactantes por Jag249.

Tabela 26 - Resultados obtidos concentração de biomassa, pH e Tensão superficial (TS) dos ensaios realizados para produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* Jag249 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes a 180 rpm e 150 rpm, 30°C, pH inicial 7,0.

180 rpm, temperatura 30°C e pH 7,0			
Tempo (h)	Biomassa (g.L ⁻¹)	pH	Tensão Superficial (mN/m)
Branco	-----	6,77 ± 0,05	57,00 ± 0,00
0	0,03 ± 0,00	6,84 ± 0,01	49,50 ± 0,55
3	0,22 ± 0,01	6,78 ± 0,01	50,00 ± 1,10
6	2,15 ± 0,01	5,64 ± 0,21	54,67 ± 0,82
8	2,33 ± 0,05	5,19 ± 0,11	56,00 ± 0,00
10	2,64 ± 0,11	4,99 ± 0,04	56,00 ± 0,00
20	2,76 ± 0,01	5,06 ± 0,06	56,42 ± 0,20
24	2,97 ± 0,07	5,15 ± 0,01	50,50 ± 0,55
30	3,26 ± 0,10	5,53 ± 0,13	52,00 ± 0,00
48	4,46 ± 0,33	5,85 ± 0,20	62,25 ± 2,46
54	3,23 ± 0,03	5,95 ± 0,04	64,50 ± 0,55
72	5,43 ± 1,61	5,42 ± 0,00	54,00 ± 0,00
150 rpm, temperatura 30°C e pH 7,0			
Tempo (h)	Biomassa (g.L ⁻¹)	pH	Tensão Superficial (mN/m)
Branco	-----	6,93 ± 0,04	57,50 ± 2,74
0	0,03 ± 0,00	6,91 ± 0,01	56,50 ± 2,74
3	0,16 ± 0,01	6,90 ± 0,01	57,50 ± 0,55
6	0,68 ± 0,03	6,10 ± 0,04	56,00 ± 2,19
8	1,88 ± 0,03	5,07 ± 0,03	53,00 ± 0,00
10	1,08 ± 1,44	4,93 ± 0,00	56,00 ± 0,00
20	3,97 ± 0,55	4,73 ± 0,15	56,00 ± 1,10
24	2,55 ± 0,41	4,71 ± 0,04	58,50 ± 1,64
30	5,10 ± 0,82	4,57 ± 0,16	53,50 ± 0,55
48	4,38 ± 0,32	5,40 ± 0,12	52,75 ± 0,82
54	4,68 ± 0,75	5,78 ± 0,18	57,75 ± 3,03
72	5,06 ± 2,09	5,92 ± 0,18	58,00 ± 2,19

Os meios de cultivo testados foram: (A) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + Extrato de Levedura; (B) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + (Na₂HPO₄); (C) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + (KH₂PO₄); (D) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + (NaCl); (E) suco de caju clarificado + (NH₄)₂SO₄ + MgSO₄.7H₂O; (F) Meio Mineral + suco

de caju clarificado + Solução de Micronutriente; (G) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes; (H) Meio Mineral, conforme descrito em 4.2.3. A Tabela 27 apresenta os resultados de concentração celular, pH e tensão superficial para os ensaios realizados variando os meios de cultivo a 150 rpm, 30°C e pH inicial 7,0.

Tabela 27 - Resultados de Concentração Celular (Biomassa), pH em Função do Tempo, para os ensaios realizados utilizando *Bacillus sp.* Jag249 variando a composição dos meios de cultivo sob agitação de 150 rpm, 30°C por 48 horas.

Amostra	Biomassa (g.L ⁻¹)	pH	Tensão Superficial (mN/m)
A – 0h	0,03	6,63 ± 0,00	53,5 ± 0,00
A - 48h	4,56 ± 0,04	4,625 ± 0,21	55,52 ± 5,65
B - 0h	0,03	6,94 ± 0,00	58,0 ± 0,00
B – 48h	0,35 ± 0,00	6,70 ± 0,05	54,00 ± 0,00
C - 0h	0,03	6,55 ± 0,00	61,00 ± 0,00
C – 48h	0,46 ± 0,02	6,26 ± 0,02	61,50 ± 0,55
D – 0h	0,03	6,22 ± 0,00	57,00 ± 0,00
D - 48h	1,10 ± 0,02	6,47 ± 0,05	52,55 ± 0,51
E - 0h	0,04	5,89 ± 0,00	64,00 ± 0,00
E – 48h	1,48 ± 0,24	6,77 ± 0,16	55,80 ± 1,98
F - 0h	0,03	6,15 ± 0,00	55,00 ± 0,00
F – 48h	2,67 ± 0,15	6,83 ± 0,01	53,50 ± 1,64
G – 0h	0,04	6,57 ± 0,00	50,00 ± 0,00
G - 48h	3,21 ± 0,19	6,07 ± 0,02	52,50 ± 2,74
H – 0h	0,03	6,65 ± 0,00	53,00 ± 0,00
H - 48h	2,85 ± 0,19	7,06 ± 0,05	62,00 ± 2,19

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 27, verificou-se no ensaio em meio de cultivo (A) concentração de biomassa de 4,56 ± 0,04 g/L com 48h de fermentação, o pH foi inferior a 6,0. Em meio de cultivo (B) obteve-se concentração celular de 0,35 ± 0,00 g/L em 48 horas, valor reduzido comparado com os outros ensaios realizados, mantendo o pH superior a 6,0. Verificou-se concentração de biomassa de 0,46 ± 0,1 g/L com 48h de fermentação em meio de cultivo (C) e o pH manteve-se maior que 6,0. O ensaio em meio de cultura (D) obteve biomassa final (48 horas) de 1,10 ± 0,02 g/L, mantendo o pH superior a 6,0. Em meio (E) verificou-se biomassa de 1,48 ± 0,24 g/L e o pH abaixo de 6,0, com tendência a acidificação. No ensaio em meio de cultivo verificou-se concentração de biomassa, o pH manteve-se acima de 6,0. Para o ensaio em meios (F), (G) e (H) verificou-se

concentração de biomassa de $2,67 \pm 0,15$ g/L, $3,21 \pm 0,19$ g/L e $2,85 \pm 0,19$ g/L, respectivamente, com 48h de fermentação e opH manteve-se superior a 6,0. Observa-se ainda na Tabela 24, que não ocorreu redução da tensão superficial nos ensaios realizados utilizando *Bacillus sp. Jag249* em nenhum dos meios de meios de cultivo testados. Barreto (2011) obteve resultados de tensão superficial de $29,4 \pm 1,4$ mN/m, em ensaios realizados com o microrganismo *Bacillus sp. Jag249*. Acredita-se que a cepa perdeu seu poder de produção, por isso não apresenta redução da tensão superficial do meio.

5.2.3. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por ICA12, ICA24 E ICA56

Para iniciar os testes com os microrganismos isolados de Icapuí, ICA 12, ICA24 e ICA56 os seguintes meios foram testados: (A) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes (MMSM), (B) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes e pré-inóculo com o meio LB Broth (MMSM/LB) e (C) Meio Suco de Caju Clarificado + Sulfato de Amônio (MSCC), sob rotação de 150 rpm, temperatura 30°C e pH inicial 7,0. O meio LB Broth Base (Lennox) é composto por Peptona (10,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L e cloreto de sódio (5,0 g/L). Dilui-se o inóculo preparado com LB Broth com solução salina (0,9%) até alcançar absorbância entre 0,1 e 0,2 em espectrofotômetro a 600 nm, antes de adicionar aos meios que serão incubados. O inóculo para os demais ensaios tem a mesma composição do meio de cultivo a ser fermentado, meio mineral adicionado de solução de micronutrientes.

A Tabela 28 apresenta os resultados de crescimento celular, pH e tensão superficial para os ensaios realizados. Observa-se na Tabela 28, baixa concentração de biomassa para ICA12 e ICA56 se comparado a ICA24, com concentração de $1,44 \pm 0,2$ g/L utilizando meio MMSM/LB para ICA12 $2,20 \pm 0,2$ g/L em MMSM para ICA56. O pH ficou acima de 6,0 para ambas as cepas. Para ICA24 verifica-se alta concentração celular chegando a $9,60 \pm 2,7$ g/L e reduziu o pH para $4,55 \pm 1,1$ em MSCC. O consumo de substrato foi total em MMSM e MMSM/LB em todos os ensaios realizados, havendo carbono residual ao utilizar suco de caju clarificado como fonte. A redução de substrato quando usou-se suco foi de $40,76 \pm 0,13$ g/L para 24, $26 \pm 6,8$ g/L (ICA12), $34,93 \pm 1,3$ g/L (ICA24) e $32,58 \pm 0,3$ g/L (ICA56).

Tabela 28 - Resultados obtidos de crescimento celular (biomassa), pH, tensão superficial e consumo de substrato em 48 horas de fermentação para ICA12, ICA24, ICA56 nos meios de cultivo (A) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes (MMSM), (B) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes e pré-inóculo com o meio LB Broth (MMSM/LB) e (C) Meio Suco de Caju Clarificado + Sulfato de Amônio (MSCC), sob rotação de 150 rpm, temperatura 30°C e pH inicial 7,0.

Amostra (48 horas)	Biomassa (g/L)	pH	Tensão Superficial (mN/m)	Substrato Residual (g/L)
MMSM – ICA12	1,04 ± 0,1	6,53 ± 0,0	28,75 ± 1,1	0,0
MMSM/LB – ICA12	1,44 ± 0,2	6,65 ± 0,0	29,55 ± 0,4	0,0
MSCC – ICA12	1,17 ± 0,0	6,69 ± 0,0	30,00 ± 0,0	24,26 ± 6,8
MMSM – ICA24	7,33 ± 0,4	6,85 ± 0,0	29,25 ± 0,4	0,0
MMSM/LB – ICA24	5,09 ± 1,5	6,52 ± 0,2	29,00 ± 0,0	0,0
MSCC – ICA24	9,60 ± 2,7	4,55 ± 1,1	28,25 ± 0,4	34,93 ± 1,3
MMSM – ICA56	2,20 ± 0,2	6,51 ± 0,3	29,75 ± 1,1	0,0
MMSM/LB – ICA56	1,72 ± 0,3	6,54 ± 0,2	29,00 ± 0,0	0,0
MSCC – ICA56	1,98 ± 0,3	6,33 ± 0,2	28,75 ± 1,1	32,58 ± 0,3

Nos ensaios contendo suco de caju clarificado partiu-se de uma concentração de açúcares redutores totais (ART), glicose e frutose em torno de 20,0 mg/L, no entanto verificou-se que o substrato residual deixado nos ensaios contendo suco estavam acima do que calculou-se para o início. Com isso, analisou-se em HPLC as concentrações do suco de caju clarificado utilizado (Safra 2010). A Tabela 29 apresenta os resultados para concentração de ART presentes no suco de caju clarificado Safra 2010 e Safra 2012.

Tabela 29 - Resultados de concentração de substrato (glicose e frutose) em suco de caju clarificado safra 2010 e safra 2012.

Substrato	Suco de caju clarificado/Safra 2010	Suco de caju clarificado/Safra 2012
Glicose (g/L)	96,44	53,34
Frutose (g/L)	96,46	56,17

Verificou-se pela Tabela 29 que ocorreu concentração de açúcares no suco de caju clarificado da safra de 2010, chegando a concentrações de 96,44 g/L de glicose e 96,46 g/L de frutose, explicando a grande quantidade de açúcares ao finalizar os ensaios com o mesmo. Ainda assim, analisou-se as concentrações obtidas de bioproduto para todos os ensaios realizados. A Tabela 30 apresenta as concentrações de surfactina obtidas.

Tabela 30 - Resultados obtidos de concentração de surfactina em 48 horas de fermentação para ICA12, ICA24, ICA56 nos meios de cultivo (A) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes (MMSM), (B) Meio Mineral + Solução de Micronutrientes e pré-inóculo com o meio LB Broth (MMSM/LB) e (C) Meio Suco de Caju Clarificado + Sulfato de Amônio (MSCC), sob rotação de 150 rpm, temperatura 30°C e pH inicial 7,0.

Meio de cultivo	Concentração de Surfactina (mg.L ⁻¹)		
	Microrganismos		
	ICA12	ICA24	ICA56
MMSM	253,32 ± 2,04	111,87 ± 0,00	26,37 ± 0,42
MMSM/LB	91,64 ± 0,00	43,77 ± 0,00	329,14 ± 0,00
MSCC	182,20 ± 0,00	113,27 ± 0,00	58,05 ± 0,00

A cepa mais promissora foi ICA56 e em segundo lugar ICA12. No entanto, em pesquisas de genes realizadas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, o teste revelou positivo surfactina para as cepas ICA24 e ICA56, enquanto para ICA12 o positivo foi para iturina. Com isso, seguiram-se as investigações com as cepas ICA24 e ICA56.

A Tabela 31 apresenta os resultados de pH e tensão superficial em ensaios realizados para produção de biosurfactantes por ICA24 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Tabela 31 - Resultados obtidos de pH e tensão superficial (TS) em ensaios realizados para produção de biosurfactantes por ICA24 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Tempo (h)	pH	Tensão superficial (mN/m)
MC	6,86 ± 0,04	56,50 ± 0,00
0	6,86 ± 0,03	56,50 ± 0,55
3	6,90 ± 0,03	47,58 ± 2,84
6	6,92 ± 0,01	38,50 ± 0,55
8	6,81 ± 0,01	37,00 ± 2,19
10	6,52 ± 0,06	28,90 ± 0,11
20	6,08 ± 0,18	29,02 ± 0,04
24	6,15 ± 0,36	29,50 ± 0,00
30	6,03 ± 0,36	29,75 ± 0,27
48	6,45 ± 0,10	30,03 ± 0,08
54	6,38 ± 0,21	29,78 ± 0,32
72	6,72 ± 0,04	30,45 ± 0,12

MC: meio de cultivo sem inóculo (Branco)

Observa-se na Tabela 31 que houve significativa redução da tensão superficial, cerca de 49% de redução, mantendo valores de tensão superficial entre $28,90 \pm 0,11$ mN/m e $30,45 \pm 0,12$ mN/m de 10 horas a 72 horas de ensaio. Como a redução da tensão superficial reproduziu-se como nos testes preliminares, mostrando redução, seguiu-se com os demais testes.

A Figura 19 apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina para ensaios realizados com o microrganismo ICA24.

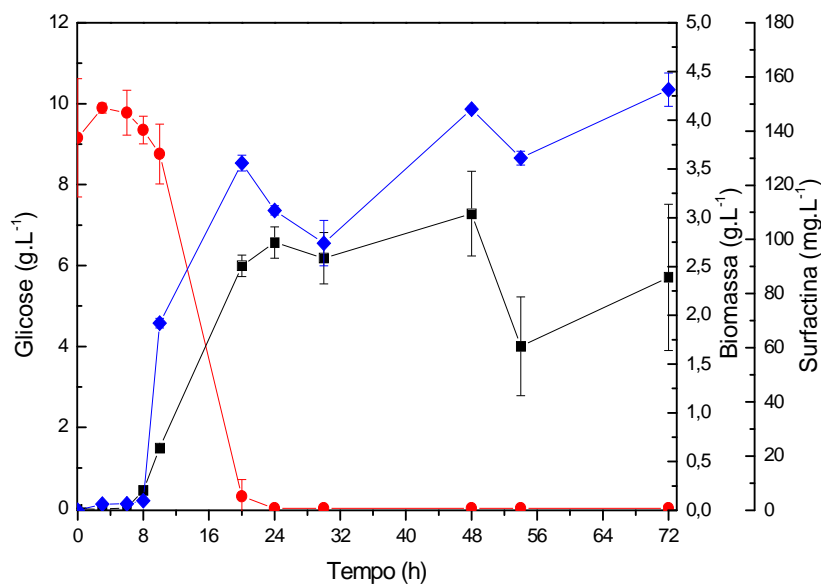


Figura 19 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e concentração de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por ICA24 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, 72 horas. (■) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (◆) Surfactina.

A Figura 19 mostra que a maior concentração celular foi alcançada em 48 horas de ensaio, com valores de $3,05 \pm 0,43$ g/L, declinando no ponto de 54 horas e com um pequeno aumento em 72 horas. O perfil de formação de produto é semelhante, no entanto maior concentração de biossurfactante é apresentada no tempo de 72 horas, com valor de $155,25 \pm 6,17$ mg/L, e em 48 horas resultado próximo, com concentração de $148,10 \pm 1,02$ mg/L. Após 20 horas de ensaio a fonte de carbono, glicose estava esgotada. Observa-se no gráfico a forte relação da formação de produto com o crescimento celular.

Com as amostras retiradas em cada intervalo de tempo da produção de biossurfactantes por ICA24, realizou-se análise de índice de emulsificação. A Tabela 32 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 32 - Resultados obtidos de índice de emulsificação (IE₂₄) para amostras do ensaio realizado para produção de biossurfactantes por ICA24 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Amostra	Óleo de Soja	Querosene	N-Hexadecano
30 h	33,12 ± 0,00	64,83 ± 0,97	64,83 ± 1,18
48 h	61,67 ± 2,36	59,36 ± 1,92	62,00 ± 2,83
54 h	62,00 ± 0,00	61,80 ± 5,81	62,83 ± 1,65
72 h	86,67 ± 9,43	61,01 ± 1,43	60,65 ± 1,44

O meio contendo surfactante foi capaz de emulsionar todas as fontes hidrofóbicas testadas com IE₂₄ predominantemente maior que 60%. Barros *et al.* (2008), ao estudar as propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira, obteve resultados semelhantes, com valores de índice de emulsão acima de 40% para a maioria das fontes testadas. Em tal estudo, o dodecil Sulfato de Sódio (SDS) apresentou resultados melhores ou bastante próximos do IE₂₄ do biossurfactante em todos os óleos analisados. Quando foram comparados os resultados de estabilidade de emulsão, o (SDS) apresentou os melhores resultados, seguido do biossurfactante (BS) produzido por *Bacillus sp.* e da lecitina de soja (LEC). De acordo com Ioussef *et al.* (2004), emulsões obtidas acima de 40%, indicam que o microrganismo é um bom produtor de biossurfactante. Após estudo cinético com ICA24, realizou-se o mesmo ensaio com ICA56.

A Tabela 33 apresenta os resultados de pH e tensão superficial em ensaios realizados para produção de biossurfactantes por ICA56 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Houve significativa redução da tensão superficial do sobrenadante livre de células rico em biossurfactante excretado por ICA56, conforme mostra Tabela 33. A tensão superficial apresentou-se bastante reduzida a partir de 10 horas de ensaio com valor de 31,50 ± 0,00 mN/m e chegando a valores de até 28,00 ± 0,00 mN/m em 30 horas. Após 72 horas de experimentos a tensão superficial foi de 29,25 ± 0,27 mN/m. Estes dados assemelham-se aos obtidos por Nitschke e Pastore (2006), e Barros *et al.* (2008) que obteve resultados de 27,01 mN/m. Barreto (2011), ao avaliar uma grande variedade de linhagens de *Bacillus sp.* selecionou como cepas promissoras, aquelas que reduziram em torno de 50% a tensão superficial do meio, com valores próximos a 30 mN/m.

Tabela 33 - Resultados obtidos de pH e tensão superficial (TS) em ensaios realizados para produção de biossurfactantes por ICA56 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Tempo (h)	pH	Tensão superficial (mN/m)
MC	7,06 ± 0,03	56,50 ± 0,00
0	7,06 ± 0,03	42,75 ± 1,37
3	7,06 ± 0,06	41,50 ± 0,55
6	7,05 ± 0,03	39,00 ± 0,00
8	7,05 ± 0,02	38,50 ± 0,55
10	6,86 ± 0,08	31,50 ± 0,00
20	6,14 ± 0,02	28,75 ± 0,27
24	6,11 ± 0,02	28,15 ± 0,16
30	6,01 ± 0,01	28,00 ± 0,00
48	6,29 ± 0,06	28,25 ± 0,27
54	6,23 ± 0,00	28,55 ± 0,49
72	6,84 ± 0,44	29,25 ± 0,27

MC: meio de cultivo sem inóculo (Branco)

A Figura 20 apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina para ensaios realizados com o microrganismo ICA56.

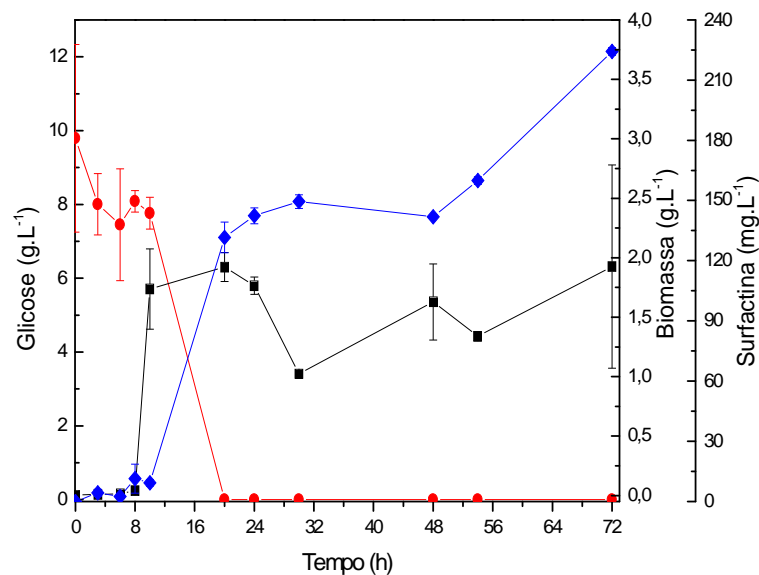


Figura 20 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e concentração de surfactina em função do tempo para produção de biossurfactantes por ICA56 em meio mineral (MM) com adição de solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, 72 horas. (■) Biomassa; (●) Concentração de Glicose; (◆) Surfactina.

No presente ensaio, obteve-se concentração de biomassa de máxima de $2,53 \pm 1,93$ mg/L no tempo de 72 horas e como aconteceu com o microrganismo ICA24, a glicose esgotou a partir de 20 horas de ensaio. A maior concentração de surfactina obtida foi $224,34 \pm 1,95$ mg/L em 72 horas de ensaio.

A Tabela 34 apresenta os resultados obtidos de índice de emulsificação (IE_{24}) obtidos a partir de emulsões formadas com o caldo fermentado por ICA56 utilizando diferentes fontes hidrofóbicas.

Tabela 34 - Resultados obtidos de índice de emulsificação (IE_{24}) para amostras do ensaio realizado para produção de biossurfactantes por ICA56 em meio mineral adicionando solução de micronutrientes, 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,0.

Amostra	Óleo de Soja	Querosene	N-Hexadecano
30 h	$47,92 \pm 22,31$	$61,48 \pm 2,36$	$61,63 \pm 3,35$
48 h	$62,54 \pm 0,59$	$63,44 \pm 0,42$	$63,30 \pm 5,71$
54 h	$56,06 \pm 11,19$	$54,47 \pm 9,39$	$63,06 \pm 0,13$
72 h	$62,40 \pm 0,80$	$63,57 \pm 0,95$	$54,40 \pm 7,26$

Observa-se pela Tabela 34 que para todas as fontes hidrofóbicas testadas, o índice de emulsificação foi acima de 50%, confirmando mais uma vez o que a literatura reporta, emulsões obtidas acima de 40%, indicam que o microrganismo é um bom produtor de biossurfactante (IOUSSEF *et al.*, 2004).

Como os resultados de concentração de surfactina produzida por ICA56 foram os mais altos obtidos em todos os ensaios realizados, este microrganismo foi escolhido para dar continuidade ao trabalho de investigação, avaliando diversos parâmetros de interesse científico tanto do biossurfactante produzido pela cepa como biodegradabilidade, toxicidade, capacidade de remediação, como outras potencialidades do microrganismo, dentre as quais, produção de enzimas bem como capacidade de degradar diferentes tipos de contaminações em solos.

5.3. ICA56: Produção de Enzimas, Caracterização do Biossurfactante Produzido, Avaliação da Toxicidade e Biodegradabilidade

Após concluída a fermentação e separadas as células por centrifugação a 9000 rpm, por 15 minutos (temperatura), o sobrenadante foi acidificado a pH 2,0 (precipitação ácida se realiza com a finalidade recuperar o bioproduto) e mantido em repouso a 4°C durante 12 h. Transcorrido este período, o biossurfactante precipitado foi separado do meio líquido por centrifugação a 9000 rpm, por 15 minutos e o bioproduto obtido foi liofilizado. Para a realização dos testes, o biossurfactante liofilizado foi ressuscitado em um volume conhecido de água destilada e o pH da solução foi ajustado entre 7,5 - 8,0. O BS assim obtido foi caracterizado em quanto aos seguintes métodos: tensão superficial (diferentes concentrações e temperaturas), tensão interfacial (25°C, 45°C, 65°C) e ângulo de contato (25°C). O rendimento médio de biossurfactante ao final dos ensaios de fermentação foi de aproximadamente $0,234 \pm 0,05$ g/L.

5.3.1. Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica

Iost e Raetano (2010) relata que a redução da tensão superficial de um sistema aquoso repercute em melhoras nos efeitos molhante (Mendonça *et al.*, 1999), espalhante e penetrante da própria solução em contato com uma superfície sólida (Greene & Bukovac, 1974), assim como aumento na velocidade de adsorção e/ou translocação (Martins *et al.*, 2009).

Na Tabela 35 apresentam-se os valores médios de tensão superficial e desvio padrão correspondente as fermentações realizadas (um total de 15). As amostras foram tomadas ao principio (meio de cultivo) e ao final (48 h, meio de cultivo livre de células) de cada experimento.

A 48 horas de fermentação, o valor da tensão superficial do meio de cultivo livre de células foi de $34,72 \pm 0,26$, indicando uma clara redução (57 %) com respeito a ST do meio de cultivo (tempo zero). Esta relevante redução na tensão superficial coloca em evidência a produção de agentes de superfície durante a fermentação.

Tabela 35 - Valores médios de tensão superficial (ST) do meio de cultivo determinados ao principio e ao final das fermentações realizadas para produção de biossurfactantes por pelo microrganismo ICA56.

Tempo (h)	ST (Mn/m)	SD
0	61,13	0,38
48	34,72	0,26

Decesaro *et al.* (2013), ao estudar a produção de biossurfactantes por uma linhagem de *Bacillus* isolada de solo contaminado com óleo diesel, obteve um valor de tensão superficial do meio de cultivo livre de células de 35,67 mN/m, resultado semelhante ao obtido no presente estudo. Adicionalmente, os autores deste trabalho também constataram uma importante redução da tensão superficial (na ordem de 33%).

Na Tabela 36 apresentam-se os resultados de CMC e de tensão superficial obtidos a 25, 45 e 65°C do biossurfactante bruto (BS que apenas passou pelo tratamento de precipitação ácida e posteriormente liofilizado). Tal e como é possível apreciar, os valores de CMC variam entre 0,02 g/L (25°C) e 0,03 g/L (65°C), indicando um leve aumento com a temperatura.

Tabela 36 - Valores de CMC e tensão superficial obtidos para o biossurfactante produzido por ICA56.

T (°C)	CMC (g/L)	TS (mN/m)
25	0,0173 ± 0,001	33,56 ± 0,37
45	0,0242 ± 0,005	32,42 ± 0,42
65	0,0310 ± 0,008	31,95 ± 0,31

Em quanto ao efeito da temperatura sobre a tensão superficial, observa-se uma diminuição com o incremento de temperatura (de 34 mN/m para 32 mn/m). De acordo com Brady & Humiston (1981), este decréscimo da tensão superficial é devido ao aumento da energia cinética das moléculas e a redução das forças interativas intermoleculares.

Os resultados de CMC obtidos neste trabalho estão de acordo com os trabalhos publicados na literatura. Os valores de CMC de biossurfactantes obtidos a partir de *Bacillus* sp. variam entre 11 e 40 mN/m (Barros *et al.*, 2007, Zeirak Nitchke, 2010; Altmajer Vaz *et al.*, 2012). As diferenças nos valores de CMC relatadas pelos diferentes autores podem ser atribuídas aos diferentes graus de purezas do biossurfactantes estudados, já que a presença de sais e/ou produtos do metabolismo celular afeta a determinação da CMC.

De acordo Rosen (1989) e Lima (2007), existem duas classes de materiais que afetam as concentrações micelares críticas, sendo a classe 1, por incorporação na micela e a classe 2 pela modificação das interações solvente-micela ou solvente-surfactante.

Cabe destacar que, embora os valores de CMC dos lipopeptídeos estão de acordo com os estudos relatados na literatura, são considerados baixos quando comparados aos surfactantes sintéticos aniônicos (Altmajer Vaz *et al.*, 2012). Por exemplo, ao comparar os valores de CMC do biosurfactante produzido com um surfactante aniônico comumente utilizado na indústria, o dodecil sulfato de sódio (SDS) que apresenta uma CMC de 2333 mg.L⁻¹ (Tavares, 1997), percebe-se a importância do investimento em estudos e produção dos biosurfactantes. O surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS) apresenta uma CMC cerca de 135 vezes mais que a do biosurfactante produzido por ICA56.

No que se refere ao efeito da temperatura sobre a CMC do bioproduto, Dehghan Noudeh *et al.* (2007) constataram que a CMC de surfactina é dependente da temperatura, seguindo uma curva de CMC - temperatura em forma de U. O valor mínimo de CMC foi atingida a 22°C, e posteriormente, no intervalo de 22-35°C, a CMC aumentou com a temperatura. Sendo assim, no intervalo 25 – 35°C, existe uma concordância entre os resultados obtidos por Dehghan Noudeh *et al.* (2007) com os determinados no presente trabalho.

5.3.2. Tensão Interfacial e Ângulo de Contato

A Tabela 37 apresenta os resultados de ângulo de contato para as três concentrações de biosurfactante estudadas (10, 20 e 60 mg/L). Tal e como se pode observar, os dados mostram uma pequena diminuição nos valores de ângulo de contato com o aumento da concentração do biosurfactante. A 25°C, os valores de AC obtidos com a concentração de 10 mg/L de biosurfactante são praticamente equivalentes ao da água MilliQ, no entanto essa concentração corresponde a metade da CMC do biosurfactante a 25°C.

A medida do ângulo de contato de uma gota sobre uma superfície é indicativo da capacidade de molhamento de uma superfície por dita solução. Quando menor que 90°, pode-se considerar que a superfície é molhada pelo líquido (hidrofílica), porém se os ângulos forem maiores que 90°, caracterizam-se superfícies hidrofóbicas (Moita Neto, 2006). No caso da água, se a superfície de deposição for hidrofóbica (com ceras), o contato será menor, a gota será

esférica e o ângulo de contato será maior. Entretanto, se a superfície for mais hidrófila, a gota se espalhará, podendo até formar um filme uniforme (Iost e Raetano, 2010). Estudos de molhabilidade geralmente envolvem a medição de ângulos de contato, os dados primários, indicam o grau de molhagem, quando um sólido e líquido interagem. Para uma dada superfície, ângulos de contato pequenos ($\ll 90^\circ$) correspondem a uma alta molhabilidade, enquanto ângulos de contato grandes ($\gg 90^\circ$) correspondem a uma baixa molhabilidade (Yuan e Lee, 2013). Zeirak e Nitchke (2010) estudaram as mudanças na hidrofobicidade na superfícies tratadas com surfactina. Segundo os autores, a surfactina causa alterações no ângulo de contato de 82° para cerca de 76° , indicando que a superfície tornou-se menos hidrófoba quando previamente tratada com soluções de surfactina. Rodriguez *et al.* (2006) também afirmou que essas mudanças na hidrofobicidade em superfícies, que modificam a adesão de microrganismos, levam a uma diminuição substancial da adesão de bactérias, sendo este comportamento especialmente interessante para aplicações em áreas médicas.

Tabela 37 - Resultados obtidos para ângulo de contato a diferentes concentrações de biossurfactante bruto produzido por ICA56.

C (mg/L)	AC (°)	SD
0	104,91	1,54
10	104,37	4,31
20	89,20	5,52
60	92,07	1,55

Os resultados de tensão interfacial (TI) a diferentes temperaturas (25, 45 e 65°C) e concentrações de biossurfactante (0, $1/2$ CMC, CMC, 3 CMC) são apresentados na Tabela 38. Observa-se que o aumento da concentração de biotensoativo repercute em uma clara redução nos valores de TI. Adicionalmente, como cabia esperar, constata-se que de forma general existe uma diminuição nos valores de TI com o aumento de temperatura. Esta influencia da temperatura sobre a tensão interfacial é análogo ao efeito causado sobre a tensão interfacial, e encontra-se amplamente reportada na literatura (Brady & Humiston, 1981; Lima, 2007).

Tabela 38 - Resultados obtidos para tensão interfacial a diferentes temperaturas e concentrações (0 mg/L; 10 mg/L (metade da CMC); 20 mg/L (CMC) e 60 mg/L - 3X CMC) de biossurfactante bruto.

C(mg/L)	TI (Mn/m)		
	25°C	45°C	65° C
0	20,03 ± 0,27	17,28 ± 0,19	15,14 ± 0,17
10	13,18 ± 0,16	12,88 ± 0,29	12,00 ± 0,42
20	10,63 ± 0,08	09,69 ± 0,39	10,32 ± 0,44
60	05,26 ± 0,08	06,33 ± 0,24	08,35 ± 0,43

5.3.3. Ensaio de Aplicação do Biossurfactante Produzido por ICA56 para a Remediação em Solos Contaminados com Óleos Lubrificantes

Os ensaios de remediação de solos contaminados com óleos lubrificantes foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação do biossurfactante produzido para este fim. Para isto, seguiu-se o procedimento experimental descrito por Moya-Ramírez *et al.* (2014), avaliando a quantidade de contaminante (massa) presente na areia ao principio e ao final do processo de lavagem. Para uma melhor compreensão do fenômeno, variou-se a temperatura (25°C, 45°C e 65°C) e a concentração de biossurfactante na solução de lavagem (20, 40 e 60 mg/L). Adicionalmente, recorreu-se a metodologia de planejamento experimental (Montgomery, 2012) e, para fins de comparação, realizaram-se também ensaios com água destilada (ensaio-controle). Na Tabela 39 se indicam os valores médios de detergência (eficiência de remoção do contaminante, %) obtidos nos diferentes ensaios de remediação realizados.

Tabela 39 - Valores de detergência (eficiência de remoção do contaminante) obtidos nos ensaios de remediação de solos contaminados com óleo lubrificante utilizando o biossurfactante produzido por ICA56.

Concentração de BS (mg/L)	Detergência (%)		
	25°C	45°C	65°C
0	59,87 ± 1,14	68,23 ± 0,88	76,01 ± 0,72
10	60,10 ± 0,08	76,49 ± 0,50	80,26 ± 0,39
20	70,70 ± 0,81	78,59 ± 0,14	82,44 ± 0,16
60	74,48 ± 0,01	84,04 ± 0,04	85,01 ± 1,02

Mediante análise estatístico dos resultados (ANOVA), verificou-se que tanto a temperatura como a concentração do biossurfactante são variáveis que afetam de forma significativa ao processo de lavagem da areia contaminada. Ajustando-se os dados experimentais apresentados na Tabela 36 a um modelo polinômico de segunda ordem, chega-se a Equação X:

$$De = 79,8919 + 6.9464BS + 7.52277T - 5.64205BS^2 (R^2 = 0.930) \quad \text{Equação 19}$$

Onde: BS corresponde a concentração de biossurfactante (mg/L), T, a temperatura (°C) e De, a detergência (%).

O termo de interação entre variáveis (concentração de biossurfactante e temperatura) foi excluído do modelo matemático, já que este não afeta de forma significativa a resposta (detergência). O modelo matemático apresentado representa de forma satisfatória os dados experimentais dentro da região experimental estudada.

Das e Mukherjee (2007) ao realizarem estudos de MEOR in situ usando uma coluna de areia empacotada, descobriram que *B. subtilis* foi eficaz na recuperação de óleo da areia dos poros. Pornsunthorntawee *et al.* (2008) descobriram que lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* exibiram eficiência de recuperação de petróleo de $61,62 \pm 0,03\%$.

5.3.4. Estabilidade da Emulsão Utilizando o Biossurfactante Produzido por ICA56 **Medida em Lumicheck**

Para os estudos de estabilidade de emulsões com o LUMiCheck (Figura 21) testaram-se três concentrações diferentes de soluções com biossurfactante: 0,1, 0,5 e 1,0 g/L. As emulsões foram formadas com auxílio do Ultraturax (1 min, 13000 rpm), usando 10 mL de solução de biotensoativo e 10 mL de dodecano.



Figura 21 - Equipamento LUMiCheck® usado para a análise da estabilidade de emulsões.

A Figura 22 apresenta os resultados dos ensaios de estabilidade da emulsão ao longo de 24 horas de acompanhamento. Analisando-se a Figura 17 observa-se uma redução relevante na estabilidade das emulsões nas primeiras horas ($\pm 2h30min$), baixando de 70% para 10% para a concentração de 1,0 g/L e de 45% para 10% com concentração de 0,5 g/L de biossurfactante. Transcorrido este período, a estabilidade das emulsões permaneceu praticamente constante. Para os testes realizados a concentração de 0,1 g/L de biossurfactante, a desestabilização da emulsão tem início já nos primeiros minutos do experimento, começando com valor de 10% ($t = 0h$) e baixando a 5%, aproximadamente, em 24 horas.

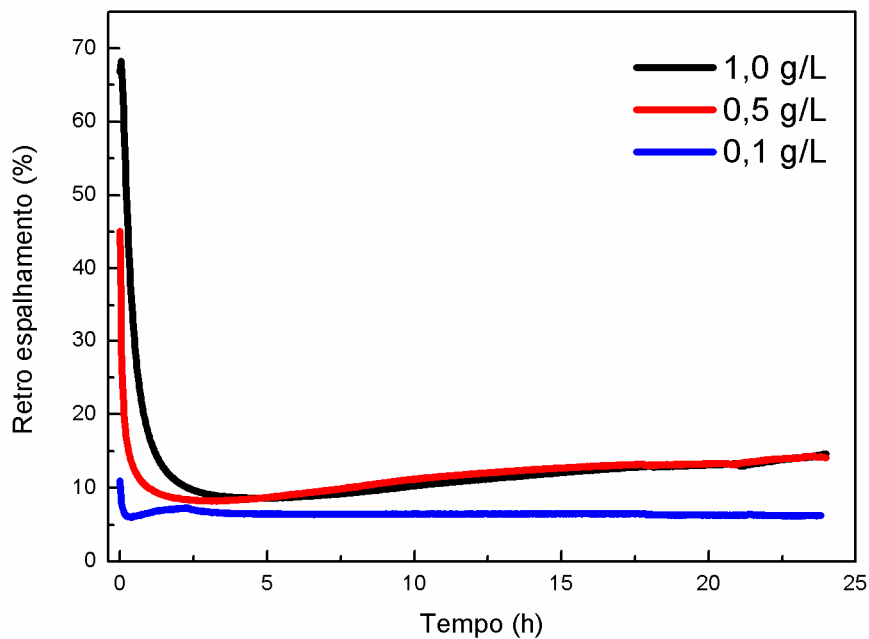


Figura 22 - Resultados obtidos de avaliação da estabilidade da emulsão realizados em LUMiCheck®.

5.3.5. Índice de Emulsão (Vórtex)

Para avaliar outro parâmetro relacionado a emulsão formada pelo biossurfactante formado pelo biossurfactante produzido por ICA56, realizou-se o teste de índice de emulsificação acompanhando a estabilidade das emulsões formadas durante 14 dias. Para representar parte dos resultados obtidos, a Tabela 40 apresenta os dados de índice emulsão obtidos após 24 horas de ensaio no final da observação, em 336 horas de experimento (IE₂₄).

Tabela 40 - Índice de emulsão obtidos após 24 h e 336 h de observação (IE₂₄) a partir de soluções de biossurfactante bruto produzido por ICA56.

Concentração de biossurfactante (g/L)	IE ₂₄ (%) 24 h Média +/- SD	IE ₂₄ (%) 336 h Média +/- SD
1,0	62,86 ± 0,0	54,28 ± 4,0
0,5	48,57 ± 0,0	34,28 ± 0,0
0,1	02,02 ± 0,0	08,57 ± 0,0

Observa-se que utilizando 1,0 g/L de biossurfactante, a emulsão praticamente mantém-se constante, apresenta uma pequena redução após 264 horas de ensaio, bem como na concentração de 0,5 g/L. A maior desestabilização é observada na concentração de 0,1 g/L. A Figura 23 apresenta os resultados dos ensaios de estabilidade da emulsão ao longo de 14 dias de experimentação.

Pode-se observar na Figura 23, que houve pouca desestabilização nas emulsões para as concentrações de 1,0 g/L e 0,5 g/L, enquanto com 0,1 g/L acontece uma rápida desestabilização logo nas primeiras horas. Segundo Faria (2010), altos valores de atividade emulsificante sugerem aplicações na indústria petrolífera para limpeza de borras oleosas em tanques de armazenamento de óleo cru, na mobilização de óleos e dutos e na recuperação melhorada do petróleo.

Altmajer Vaz *et al.* (2012) observou comportamento semelhante ao avaliar a performance da produção de biossurfactantes por linhagem de *Bacillus subtilis* isoladas de óleo cru comparado com surfactantes químicos comerciais. Nas maiores concentrações de biossurfactante avaliadas (1,0 e 0,5 g/L), praticamente a estabilidade ficou entre 40 e 60% ao longo das 336 horas de observação, enquanto para 0,1 g/L houve maior desestabilização ao longo do tempo.

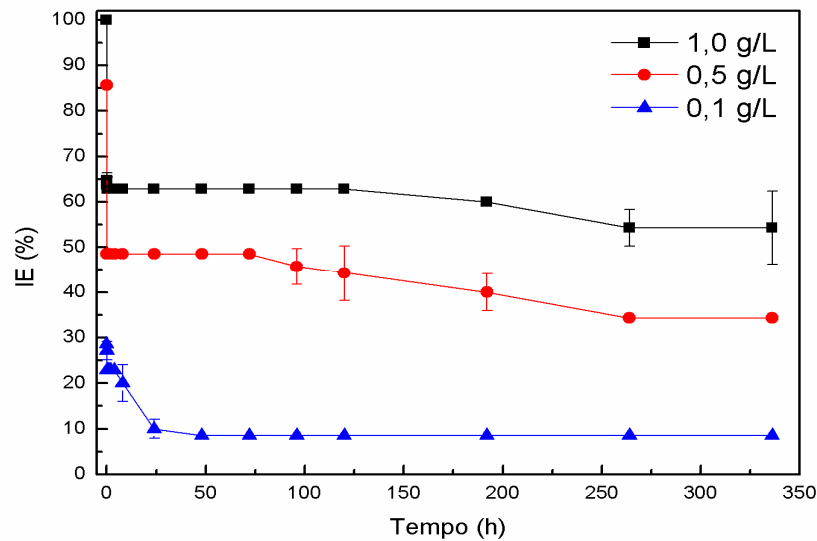


Figura 23 - Resultados obtidos para índice de emulsificação (IE%) realizados em vortex a diferentes concentrações de biossurfactante e a 25°C por 14 dias.

5.3.6. Estabilidade do Biossurfactante Produzido Frente à Temperatura, pH e Concentração de NaCl

Estudou-se a estabilidade do biossurfactante produzido por ICA56 frente a variações de temperatura, pH e concentração de NaCl. A concentração utilizada para realização dos testes foi a correspondente a CMC do BS a 25°C (20 mg/L, aproximadamente). Na Figura 24 apresentam-se os resultados de estabilidade do biossurfactante a pH 7,0 frente a diferentes temperaturas (25, 45 e 65°C). As medidas de TS foram realizadas na mesma temperatura em que a solução de biossurfactante foi submetida, isto é 25, 45 e 65°C. Analisando-se os resultados apresentados na Figura X, observa-se que no intervalo 25 – 65°C, os valores de tensão superficial variam entre 34 e 38 mN/m. Verifica-se no ensaio a 25°C, que existe um aumento de 11% na tensão superficial em 72 horas de experimento, indicando a existência de degradação de BS neste período. Acredita-se que essa degradação se dá por contaminação bacteriológica do meio rico em surfactante, uma vez que a temperatura é propícia a proliferação de bactérias e o manuseio diário para realização das medidas de tensão superficial não podem ser feitas de maneira estéril. Sabe-se que o biossurfactante inclusive em

alguns ensaios fermentativo logo pode ser consumido pelo próprio microrganismo que o excreta.

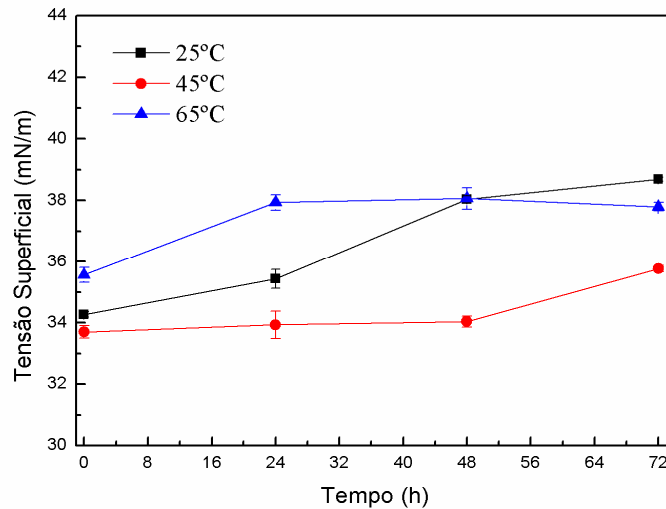


Figura 24 - Resultados da avaliação de estabilidade do biossurfactante frente a temperatura e tempo (25, 45, 65°C em intervalos de 0h, 24, 48 e 72h).

Acredita-se que essa degradação se dá por contaminação bacteriológica do meio rico em surfactante, uma vez que a temperatura é propícia a proliferação de bactérias e o manuseio diário para realização das medidas de tensão superficial não podem ser feitas de maneira estéril. Sabe-se que o biossurfactante inclusive em alguns ensaios fermentativo logo pode ser consumido pelo próprio microrganismo que o excreta.

Verifica-se ainda, nas primeiras 24 horas, uma maior variação da tensão superficial no ensaio a 65°C, que logo tende a manter-se constante. A temperatura de 45°C foi onde obteve-se maior estabilidade, mantendo tensão superficial em torno de 33,5 mN/m até 48 horas, apresentando um pequeno aumento em 72 horas de ensaio para aproximadamente 35,0 mN/m.

Em relação a temperatura, realizou-se ainda, um teste a 120°C por 60 minutos. Mediu-se a tensão superficial da solução de biossurfactante com concentração de 20,0 mg/L a 25°C e autoclavou-se. Após 60 minutos de exposição ao calor de 120°C, mediu-se outra vez a tensão superficial (também a 25°C) para verificar a estabilidade do biossurfactante frente a submissão a alta temperatura e longo tempo. Antes de autoclavar a tensão obtida foi de $33,70 \pm 0,07$ mN/m e após autoclavagem foi $32,93 \pm 0,31$ mN/m. Os resultado mostram que o

biossurfactante produzido por ICA56 é altamente resistente a altas temperaturas por períodos prolongados, pois manteve a tensão superficial constante mesmo após exposição durante uma hora a 120°C.

A literatura relata que biossurfactantes que apresentam elevada estabilidade frente à temperatura e portanto podem ser utilizados em ambientes com condições severas. Horowitz *et al.* (1990) ao estudar o lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2 verificou que o mesmo é estável a temperaturas em torno de 75°C por 140h e pH entre 5,0 e 12,0. Resultados semelhantes foram obtidos para o biossurfactante produzido por ICA56.

Após realizarem-se os ensaios com variação de temperatura, optou-se por avaliar as concentrações de pH e sal a 45°C, temperatura onde foi observada uma melhor estabilidade do biossurfactante. A 25°C o meio contendo o biotensioativo está mais propício a invasão de bactérias, e o mesmo pode ser consumido, visto que contém carbono, influenciando nos resultados de tensão superficial.

O efeito do pH sobre a estabilidade do biossurfactante pode ser visualizado através da Figura 25. Tomando-se como referência os resultados a pH 7,0, observa-se que a tempo zero, existe um aumento da TS para os ensaios realizados a pH superiores a 10,0 e inferiores a 4,0. Este comportamento está de acordo com o publicado por outros investigadores (Altmajer Vaz *et al.*, 2012), e constatando-se que causa da dita variação é a insolubilização do biossurfactante (lipopeptídeo) em valores extremos de pH.

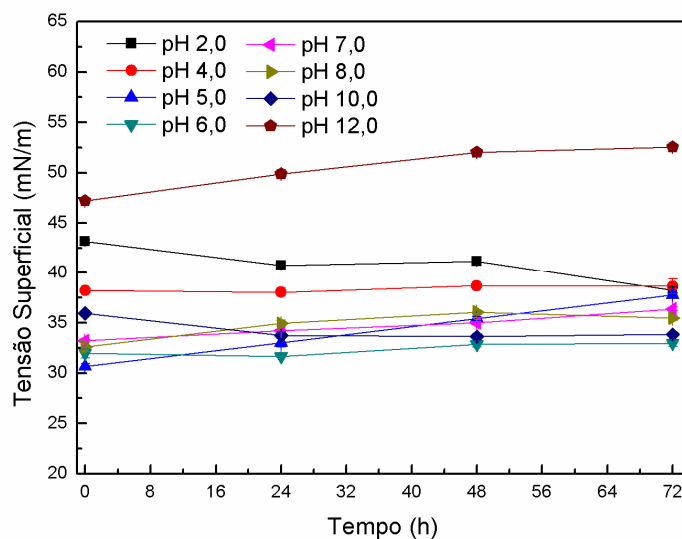


Figura 25 - Resultados da avaliação de estabilidade do biossurfactante frente a variação de pH (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0) e temperatura de 45°C em intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas.

Na Tabela 41 apresentam-se os resultados dos estudos de estabilidade das soluções de biossurfactante frente às diferentes concentrações de NaCl. Percebe-se uma pequena variação da tensão superficial ao longo das 72 horas de experimentação para os ensaios realizados em pH de 5,0 a 10,0, mantendo a tensão superficial em valores entre $30,67 \pm 0,24$ mN/m e com um máximo de $37,77 \pm 0,22$ mN/m.

Tabela 41 - Resultados da avaliação de estabilidade do biossurfactante frente a variação de pH (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0) e temperatura de 45°C em intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas.

T (h)	pH 2,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
0	$43,17 \pm 0,18$	$38,23 \pm 0,11$	$30,67 \pm 0,24$	$31,97 \pm 0,44$
24	$40,80 \pm 0,20$	$38,07 \pm 0,38$	$33,03 \pm 0,44$	$31,67 \pm 0,09$
48	$41,20 \pm 0,27$	$38,70 \pm 0,20$	$35,43 \pm 0,22$	$32,87 \pm 0,29$
72	$38,27 \pm 0,29$	$38,67 \pm 0,71$	$37,77 \pm 0,22$	$32,97 \pm 0,31$
T (h)	pH 7,0	pH 8,0	pH 10,0	pH 12,0
0	$33,20 \pm 0,13$	$32,60 \pm 0,47$	$35,97 \pm 0,16$	$47,20 \pm 0,27$
24	$34,23 \pm 0,04$	$34,97 \pm 0,31$	$33,77 \pm 0,36$	$49,90 \pm 0,40$
48	$35,00 \pm 0,13$	$36,07 \pm 0,11$	$33,63 \pm 0,18$	$52,03 \pm 0,11$
72	$36,40 \pm 0,20$	$35,47 \pm 0,24$	$33,83 \pm 0,09$	$52,53 \pm 0,24$

Percebe-se pouca variação da tensão superficial ao longo das 72 horas de experimentação para os ensaios realizados em pH de 5,0 a 10,0, mantendo a tensão superficial em valores entre $30,67 \pm 0,24$ mN/m e com um máximo de $37,77 \pm 0,22$ mN/m.

A Figura 26 apresenta os resultados dos ensaios de estabilidade do biotensoativo realizados a 45°C com diferentes concentrações de sal. Como pode ser verificado, nas primeiras 24 horas de experimento, os valores de tensão superficial praticamente permanecem constantes para concentrações de sal de 10 a 30 g/L. Já para os ensaios com 40 e 50 g/L de NaCl, existe um aumento abrupto na tensão superficial nas primeiras 24 horas. Outro aspecto a destacar é o seguinte: somente os experimentos realizados com uma concentração de NaCl de 10 g/L apresentaram valores de tensão superficial estáveis ao longo do tempo (72 h). Para todas as demais concentrações, este comportamento varia, aproximando-se aos 38 mN/m em 72 horas de teste.

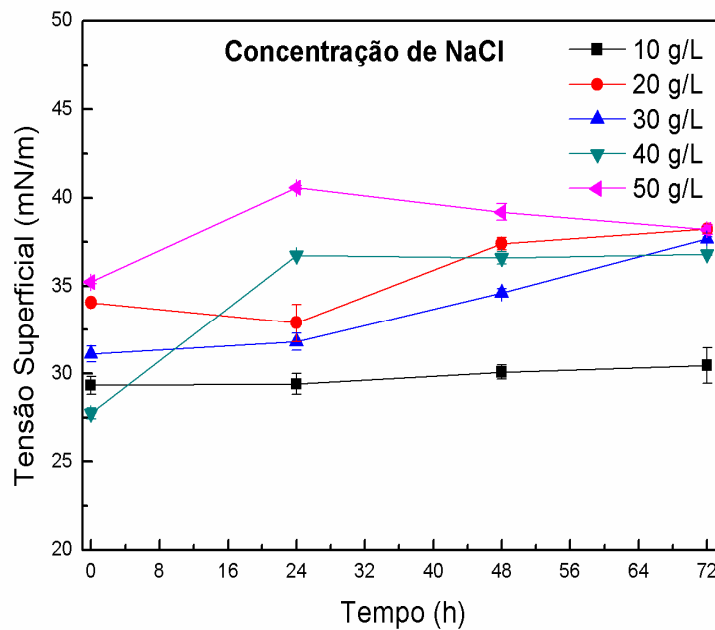


Figura 26 - Resultados da avaliação de estabilidade do biossurfactante frente a diferentes concentrações de sal e temperatura de 45°C em intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas (10, 20, 30, 40 e 50 g/L de NaCl).

Segundo Bognolo (1999) os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl, enquanto concentrações salina de 2 a 3% são suficientes para inativar surfactantes convencionais.

5.3.7. Ensaio de Biodegradabilidade

5.3.7.1. Ensaio de Biodegradabilidade Utilizando *Pseudomonas putida*

Dois tipos de ensaios foram realizados para avaliar a biodegradabilidade do biossurfactante produzido. O primeiro foi utilizando o microrganismo *Pseudomonas putida*, um gênero de bactéria gram-negativa, em forma de bastonete. Essa bactéria desempenha um papel muito importante na decomposição que aciona o ciclo de carbono. Testes demonstraram que a *P. putida* pode quebrar todos os tipos de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. As bactérias *Pseudomonas putida* CECT324 foram adquiridas da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (Valência, Espanha). No cultivo estão presentes duas fontes de carbono, a proveniente

do biotensoativo ensaiado e a fonte de carbono biodegradável do meio criogênico que está presente no estoque bacteriano. A avaliação da biodegradação é realizada medindo o Carbono Orgânico Dissolvido (COD), realizada em equipamento analisador de carbono TOC-V CSH. Tomaram-se amostras no tempo zero e repetiu-se o procedimento transcorridas as 72 horas para determinar o COD_f. A Figura 27 representa a porcentagem de eficiência da biodegradação versus concentração de biossurfactante, após 72 horas. Observa-se que em concentrações de 5,0 a 100 mg/L houve mais de 60% de eficiência na degradação do biotensoativo. Apenas concentrações acima de 100 mg/L que não se obteve valores acima de 50% de eficiência.

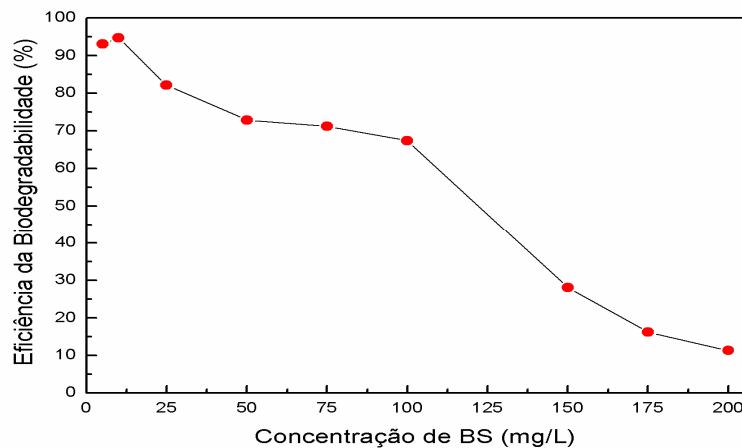


Figura 27 - Representação gráfica dos resultados obtidos para ensaio de eficiência da biodegradabilidade do biossurfactante produzido por ICA56 realizados com *P. putida*.

O parâmetro mais importante nesse tipo de teste é o de B50, ou seja, 50% de biodegradação, que corresponde no presente ensaio a uma concentração de 122,1 mg/L. O presente biotensoativo produzido por ICA56, causa baixa inibição da atividade metabólica das bactérias, e, as mesmas são capazes de alimentarem-se de altas concentrações do tensoativo sem chegar a morrer. Lechuga *et al.* (2012), encontrou ef% a 50% em torno de 20 mg/L. O biossurfactante produzido por ICA56 tem ef% a 50% 6x mais a concentração que o surfactante comercial testado pelos autores, provando assim, ser altamente seguro para o meio ambiente.

5.3.7.2. Ensaio de Biodegradabilidade: Método Estático

O segundo teste realizado foi o chamado método estático. Utiliza-se este ensaio para determinar a biodegradabilidade de tensoativos aniônicos e não iônicos. O método consiste em inocular uma pequena quantidade de microrganismos aeróbios, procedentes de uma população mixta e aerada, em um meio aquoso nutritivo de composição química definida apto para o crescimento microbiano (Cara, 2012; Ruiz, 2010). O inóculo foi obtido numa estação depuradora de águas residuais urbanas “UTE EDAR GRANDA SUR” (Granada – Espanha). Nesse meio aquoso adicionou-se concentrações conhecidas do biotensativo que desejou-se avaliar. Utilizou-se erlenmeyers de 2,0 L de capacidade, com 1,2 L de meio de cultivo. Adicionou-se aos meios, 0,5 ml de inóculo e incubou-se a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em agitação de 125 rpm. Esse método tem duração de 28 dias, de acordo com a norma utilizada. Analisou-se o consumo de carbono orgânico dissolvido (COD), em TOC ao longo dos dias de experimentação a fim de avaliar a biodegradabilidade. Estudou-se as concentrações de biotensativo de 0 (Controle/Branco), 10, 25, 50, 100 e 200 mg/L ao longo dos 28 dias de ensaio. A Figura 28 representa a quantidade de Carbono orgânico dissolvido (COD) ao longo do tempo nas diferentes concentrações de biotensativo testadas.

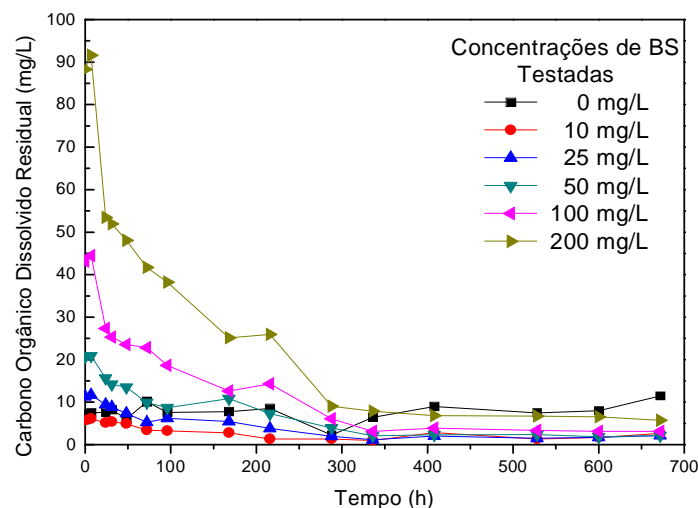


Figura 28 - Carbono Orgânico Dissolvido Residual (COD) para teste de biodegradação do biossurfactante produzido por ICA56 para diferentes concentrações testadas utilizando como inóculo uma população aerada e mixta.

Pode-se verificar que na maior concentração de biossurfactante testada (200 mg/L) em 336 horas (14 dias) a quantidade de carbono orgânico dissolvido é inferior a 10 mg/L, demonstrando que o biossurfactante avaliado é altamente biodegradável.

A Figura 29 representa a % de Biodegradação Final para testes realizados com o biossurfactante produzido por ICA56.

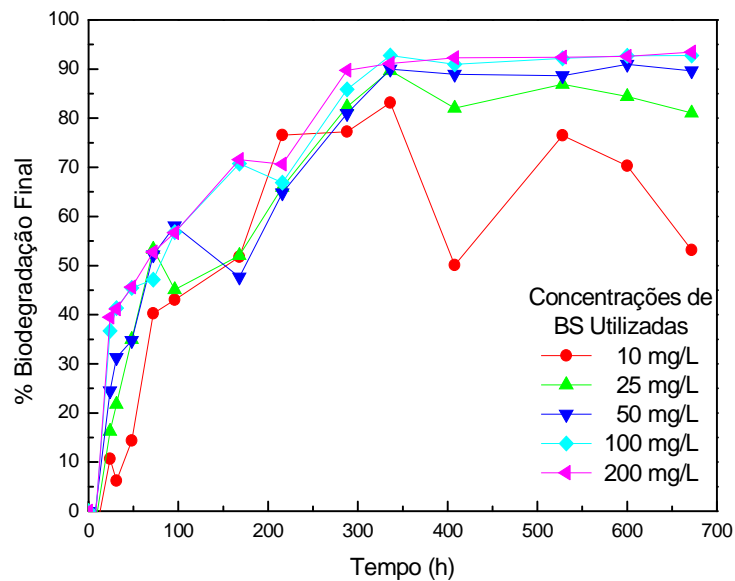


Figura 29 - Biodegradação final (%) do biossurfactante produzido por ICA56 para diferentes concentrações testadas utilizando como inóculo uma população aerada e mixta.

5.3.8. Toxicidade em Organismos Marinhos

5.3.8.1. Toxicidade do Biossurfactante em Microalgas (Selenastrum Capricornutum)

Sabe-se que as algas são provedoras do oxigênio de ambientes aquáticos constituindo o primeiro nível da cadeia trófica e são usadas como indicadores in-situ da qualidade das águas, sendo de grande importância o estudo da toxicidade sob a as mesmas para a preservação do meio ambiente. (SIBILA, 2008; RUIZ, 2010). Tais organismos são muito importantes para o equilíbrio ambiental, pois tem papel importante nos ambientes em que vive. Avaliar a toxicidade de algas é de grande valia ao se tratar de substâncias que podem vir a contaminar ambientes aquáticos, podendo causar graves danos pelo

desconhecimento do seu comportamento quanto a esses organismos. Abaixo seguem resultados obtidos para ensaios realizados a fim de avaliar a toxicidade em algas do biotensoativo produzido por ICA56.

A Tabela 42 apresenta os resultados de concentração de BS testadas, % inibição do crescimento encontradas e o log da concentração de BS para cálculo da EC₅₀.

Tabela 42 - Concentração de BS (mg/L) utilizadas para ensaios de toxicidade em algas, % inibição encontradas e Log da concentração de BS.

Concentração mg/L	% Inibição	Log(Conc)
CONTROLE	0,00	-----
300	66,31	2,4771
200	62,74	2,3010
100	57,27	2,0000
50	46,27	1,6990
25	38,63	1,3979

Representando um gráfico % inibição versus Log da concentração do biotensoativo utilizada, obtém-se uma reta, onde pode-se calcular a IC₅₀. Obtém-se y a partir da equação da reta encontrada e o inverso de Log do valor encontrado para y é a IC₅₀ (Figura 30 e 31).

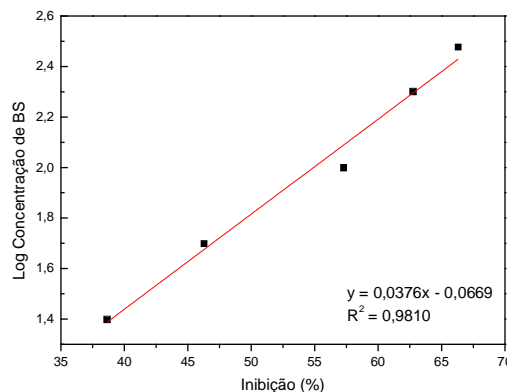


Figura 30 -. Linearização entre a % de inibição e Log da concentração de biossurfactante produzido por ICA56 testada para avaliação da toxicidade em microalgas do tipo *Selenastrum capricornutum*.

$$\begin{aligned}
 & \underline{\underline{Y (50\% inibição) = 1,8131}} \\
 & \underline{\underline{\text{Inverso de Log para } y = EC_{50}}} \\
 & \underline{\underline{IC_{50} (mg/L) = 65,03}}
 \end{aligned}$$

Ruiz (2010), ao estudar a ecotoxicidade de diversos tensoativos comerciais em diferentes organismos marinhos, observou a partir dos resultados obtidos, que as microalgas são os organismos menos sensíveis aos efeitos tóxicos para a maioria dos tensoativos puros ensaiados, com uma faixa de IC₅₀ entre 7,08 e 1112,93 mg/L.

Realizou-se o mesmo ensaio com um tensoativo químico comercial, a saponina (Sigma Aldrich) a fim de comparar o comportamento do biotensoativo excretado pelo microrganismo ICA56 e um tensoativo comercial frequentemente utilizado. Existem poucos estudos com biotensoativos para que se possa compará-los devido especialmente o pouco uso dos mesmos a nível industrial. Na Tabela 43 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 43 - Concentração de saponina (mg/L) utilizadas para ensaios de toxicidade em algas, % inibição encontradas e Log da concentração de BS.

Concentração mg/L	% Inibição	Log(Conc)
CONTROLE	0,00	-----
90	61,61	1,9542
70	65,65	1,8451
50	56,28	1,6990
30	39,99	1,4771
10	31,95	1,0000

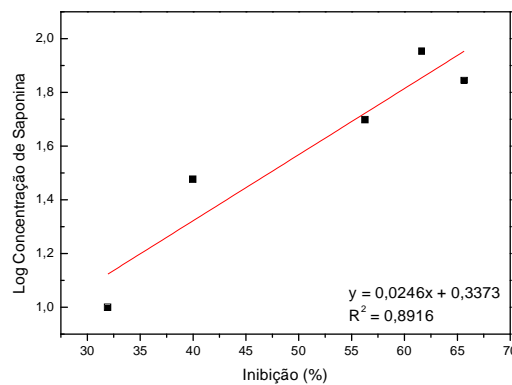


Figura 31 - Linearização entre a % de Inibição e Log da concentração de Saponina (Sigma Aldrich) testada para avaliação da toxicidade em microalgas do tipo *Selenastrum capricornutum*.

$$Y (50\% \text{ inibição}) = 1,5673$$

$$\text{Inverso de Log para } y = EC_{50}$$

$$IC_{50} (mg/L) = 36,92$$

Normalmente, as concentrações de tensoativo presentes no meio, são abaixo da CMC. Para o biossurfactante produzido por ICA56, a de IC_{50} encontrada foi três vezes o valor da CMC, portanto pode-se considerar seu uso seguro, uma vez que não serão aplicados valores maiores que a CMC. Paixão *et al.* (2002) ao avaliarem a toxicidade aguda do DSS para a microalga *Tetraselmis chuii*, durante 96 horas de exposição, obtiveram valores médios de CI_{50} , encontrados através do percentual de inibição do crescimento das microalgas foram de 11,21mg/L a 21,87mg/L. A CI_{50} é definida como a concentração inibitória a 50% de organismos-teste, utilizada para a análise de ensaios com medidas de dados contínuos, assim como a reprodução. Ruiz (2010), ao avaliar a toxicidade de uma gama de tensoativos químicos do tipo ácidos alquil éter carboxílicos em microalgas do tipo *Selenastrum capricornutum*, obteve concentrações de EC_{50} para AKYPO RLM-25, AKYPO RLM-100, AKYPO LF1 e AKYPO LF2 de 7,08 mg/L, 26,01 mg/L, 76,42 mg/L e 76,26 mg/L respectivamente enquanto para AKYPO LF4 e AKYPO LF6 encontrou valores de EC_{50} de 331,89 mg/L e 750 mg/L, respectivamente.

5.3.8.2. Toxicidade do Biossurfactante ao Microcrustáceo *Daphnia magna*

Utilizou-se para os testes o Kit DAPHTOXKIT F^{FM} magna, onde os microrganismos de prova são microcrustáceos *Daphnia magna* Straus (Clodocera, Crustacea). A medida se baseia na morte ou imobilização dos microcrustáceos como consequência do efeito tóxico do produto testado após 24 horas de exposição. Realizaram-se testes com o biossurfactante produzido e com um tensoativo comercial, a saponina para fins de comparação.

Fazendo o logaritmo da concentração do tensoativo versus % efeito e traçando uma reta obtém-se uma equação para calcular-se a IC_{50} . Após obter-se a equação aplica-se ao resultado o inverso de Log e tem-se o valor em mg/L da IC_{50} .

De acordo com os resultados obtidos tem-se para o biossurfactante, os resultados representados na Tabela 44:

Tabela 44 - Resultados obtidos para %Efeito inibitório realizados em microcrustáceos da espécie *Daphnia magna* variando a concentração de biossurfactante produzido por ICA56.

Concentração do Tensoativo (mg/L)	% Efeito Inibitório
800	100
400	95
200	40
100	15
50	5
25	5

Obteve-se $IC_{50}=170,09$ mg/L para o biossurfactante. Os resultados mostram que o efeito inibitório do biossurfactante produzido por ICA56 é praticamente 10 vezes mais que a concentração da sua CMC a 25°C.

Realizaram-se os mesmos experimentos com as mesmas concentrações para o tensoativo químico, saponina, da Sigma Aldrich para efeitos de comparação sobre o efeito tóxico de ambos. A Tabela 45 apresenta os resultados obtidos para Saponina.

Tabela 45 - Resultados obtidos para % Efeito inibitório realizados em microcrustáceos da espécie *Daphnia magna* variando a concentração do tensoativo químico comercial, Saponina.

Concentração do Tensoativo (mg/L)	% Efeito Inibitório
800	100
400	95
200	65
100	65
50	0
25	0

Para Saponina obteve-se o valor de $IC_{50}=128,44$ mg/L. Com esses valores, observa-se que o biossurfactante é menos tóxico que a saponina para esse tipo de microrganismo, levando em conta que a CMC do biossurfactante estudado é cerca de 20 mg/L a 25°C e sua IC_{50} é quase dez vezes o valor de sua CMC, concentração que seguramente não será aplicada em nenhuma situação. Mitra e Dungan (1997) ao estudarem as propriedades

micelares da saponina Quillaja: efeitos da temperatura, sal, e pH em soluções, encontrou CMC entre 0,5 e 0,8 g/L a temperaturas de 298K e 325K, respectivamente. Tomando como base a CMC da saponina Quillaja, observa-se que a IC_{50} da saponina utilizada no presente estudo está abaixo da sua CMC, com concentração 128,0 mg/L. Villegas-Navarro *et al.* (1999) determinaram a toxicidade aguda do DSS para o microcrustáceo *Daphnia magna*, e obtiveram a CL_{50} entre 14,5mg/L e 16,2mg/L. Romanelli (2004) ao avaliar a toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LASS, verificou que o DSS apresentou elevada toxicidade aguda ao organismo *Daphnia similis*, tanto em 24 horas (11,81%) como em 48 horas (5,21%) de exposição.

5.3.8.3. Toxicidade do Biossurfactante em Bactérias Marinhas Luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177

Os ensaios de toxicidade realizados utilizando bactérias marinhas luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 como microrganismos de prova, mediante o método LUMISTox, seguiram a NORMA UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2). A medida de toxicidade neste ensaio baseia-se na inibição da intensidade luminosa da bactéria marinha depois de um determinado tempo de exposição com a substância a ser avaliada a intensidade tóxica e um controle não tóxico. Gama é calculado através de uma equação a partir de dados de luminescência obtidos no equipamento especial em que foi realizado o teste. Os resultados para avaliação são aqueles obtidos após 15 e 30 minutos de exposição, no entanto os resultados de 15 minutos são os mais relevantes. Realizaram-se testes utilizando o biossurfactante produzido por ICA56 e um tensoativo comercial, a saponina (Sigma Aldrich). As Figura 32 e 33 (EC_{50} 15 min e EC_{50} 30 min) representam os dados de Log de Gama versus log concentração para obtenção da equação para cálculo da EC_{20} e EC_{50} com ambos os tóxicos testados, biossurfactante produzido por ICA56 e saponina.

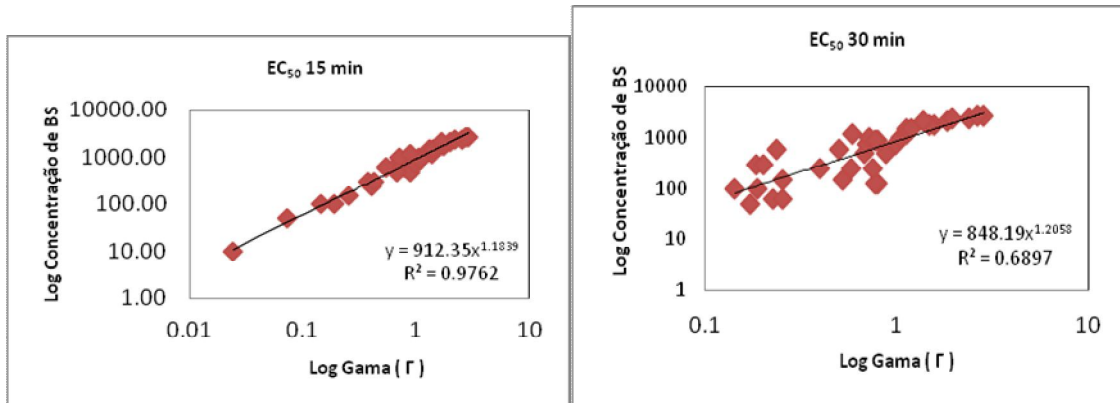


Figura 32 - Representação gráfica de Log de Gama versus Log da concentração de biossurfactante testado com o microrganismo luminescente *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 (15 minutos e 30 minutos de exposição).

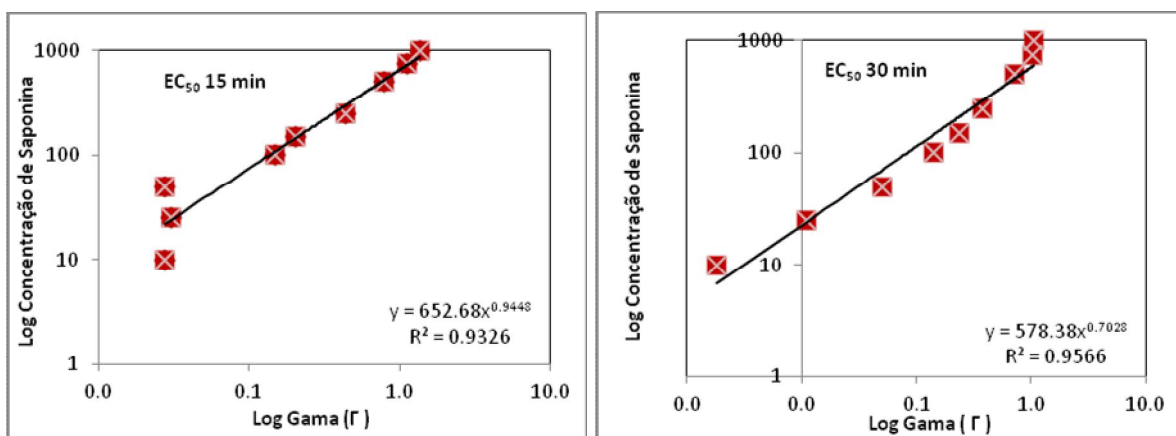


Figura 33 - Representação gráfica de Log de Gama versus Log da concentração de saponina testado com o microrganismo luminescente *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 (15 minutos e 30 minutos de exposição).

De acordo com a equação, as concentrações tóxicas encontradas para *Vibrio fischeri* após 15 minutos de exposição ao biossurfactante testado foi de $EC_{20} \pm 176,76$ mg/L e $EC_{50} \pm 912,35$ mg/L, enquanto para 30 minutos de exposição obteve-se $EC_{20} \pm 159,42$ mg/L e $EC_{50} \pm 848,19$ mg/L. Para saponina obteve-se $EC_{20} \pm 176,31$ mg/L e $EC_{50} \pm 652,68$ mg/L após 15 minutos de exposição e para 30 minutos os resultados obtidos foram $EC_{20} \pm 218,32$ mg/L e $EC_{50} \pm 578,38$ mg/L. Com isso, verifica-se que o biossurfactante produzido para causar morte de 50% dessa espécie necessita de quase 1,0 g/L, correspondente a 50 vezes sua CMC, mostrando assim que o bioproduto é seguro para tais organismos. Kaiser & Palabrica (1991) determinaram a toxicidade aguda para diversos compostos orgânicos, entre eles o LAS C12, utilizando a bactéria luminescente *Vibrío fischeri*. A CE_{50} obtida para o LAS foi igual a 1,51 mg/L, resultado que expressa a alta toxicidade do tensoativo químico para essas espécies. Li & Scliröder (2000) obteve valores de CE_{50} de 198mg/L para o alquiléter arboxilato em

testes com *Daphnia magna*, 90mg/L quando testou em *Vibrio fischeri* e para o sulfoxinato foram 30mg/L (*Daphnia magna*) e 27mg/L (*V. fischeri*).

5.3.9. Inibição do Crescimento do Microrganismo Produtor de Biossurfactantes ICA56 em Placas Contendo Diferentes Contaminantes

Com o intuito de dar continuidade a trabalhos com a cepa ICA56 para produção e aplicação em áreas de interesse em que a mesma se adéqua, resolveu-se avaliar a sua capacidade de crescimento em ambientes contaminados com diferentes resíduos potenciais ofensores no meio ambiente para uma posterior avaliação da degradação desses contaminantes. Como verificou-se que o microrganismo é um bom produtor de um potencial biotensioativo pode ser um bom degradador de contaminantes que agridem o meio ambiente. No entanto, é necessário verificar se o mesmo é resistente a essas fontes contaminantes. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) corresponde a quantidade mínima necessária de uma substância para inibir o crescimento do microrganismo-teste. No presente estudo, placas petri contendo meio nutritivo tipo APGE (Ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) com pequenos poços perfurados foram repicadas e em cada poço colocou-se aproximadamente 0,750 ml de diferentes contaminantes (1 – Óleo de motor usado; 2 – Mistura de óleo de girassol/oliva usado (80:20 p/p); 3 – Mistura de óleo de girassol/oliva virgem (80:20 p/p); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha). Incubou-se em estufa a 30°C por 48 horas e após esse período verificou-se se houve formação de halo ao redor dos poços, indicando poder inibitório da fonte contaminante. Para nenhum dos produtos avaliados, houve inibição. O microrganismo ICA56 foi capaz de crescer muito bem na presença de todos, e, provavelmente até utilize alguns como fonte de crescimento. A Figura 34 apresenta fotos das placas com repique microbiano e poços contendo os contaminantes a serem testados.

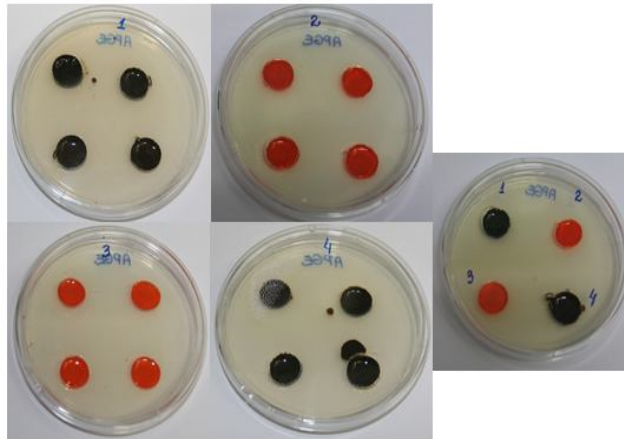


Figura 34 - Placas APGE (ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) repicadas com o microrganismo ICA56 na presença de diferentes contaminantes ambientais (1 – Óleo de motor usado; 2 – Mescla de óleo de girassol/oliva usado (80:20); 3 – Mescla de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha).

A Figura 35 apresenta os resultados qualitativos para inibição de crescimento bacteriano frente aos contaminantes após 48 horas de incubação em estufa a 30°C.

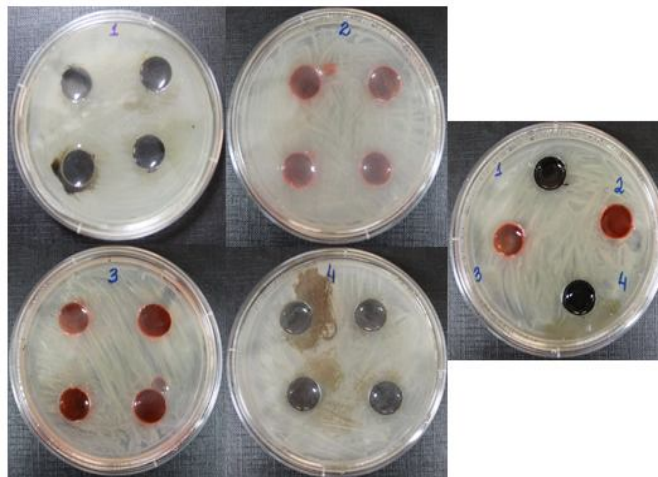


Figura 35 - Placas APGE (ágar, peptona, glicose e extrato de levedura) repicadas com o microrganismo ICA56 na presença de diferentes contaminantes ambientais após 48 horas de incubação a 30°C (1 – Óleo de motor usado; 2 – Mescla de óleo de girassol/oliva usado (80:20); 3 – Mescla de óleo de girassol/oliva virgem (80:20); 4 – Amostras de Petróleo oriundos de uma fabrica em Madrid - Espanha).

5.3.10. Degradação em Placa

Após avaliar a resistência do microrganismo produtor de biossurfactante ICA56 aos contaminantes Óleo de Motor Usado, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80/20) virgem, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80/20) usado e Petróleo (Oriundo da Espanha) impregnados em areia, resolveu-se verificar seu poder de degradação dos mesmos. As mesclas óleo foram coloridas com Sudan III, um corante alimentício, para melhor visualização da degradação.

As seguintes composições foram estudadas:

1. Areia/Petróleo/Inóculo (10:1:1); Areia/Petróleo/Inóculo (10:2:1); Areia/Petróleo/Inóculo (10:3:1);
2. Areia/Óleo de Motor Usado/inóculo (10:1:1);
3. Areia/Mescla Óleo Girassol/Oliva (80:20) Virgem (10:1:1) e
4. Areia/Mescla Óleo Girassol/Oliva (80:20) Usado (10:1:1).

A Figura 36 apresenta a avaliação qualitativa da degradação do petróleo frente a diferentes concentrações, incubado a 30°C, por 15 dias. Observa-se que há degradação com o passar dos dias, mesmo aumentando a concentração de petróleo o inóculo bacteriano continua agindo. Acredita-se que com maior concentração de petróleo melhora até a dispersão das células, facilitando o consumo do contaminante pelo microrganismo.

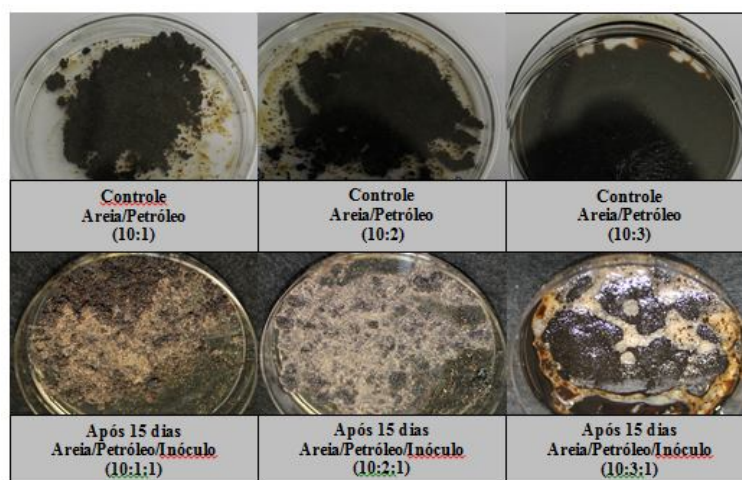


Figura 36 - Degradação em placas de areia contaminada com diferentes concentrações de petróleo por inóculo de *Bacillus sp.* ICA56.

A Figura 37 representa a avaliação qualitativa feita para degradação de óleo de Motor Usado, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80/20) virgem, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80/20) usado. Observa-se que houve consumo dos contaminantes pelo microrganismo. Para Óleo de Motor Usado, percebe-se pouca diferença de coloração, no entanto após 15 dias, pode-se observar que a placa que contém inóculo apresenta-se com uma coloração mais clara que a do controle (sem inóculo), indicando que houve consumo. O óleo de motor usado é um contaminante de coloração bastante escura e possui muitos metais pesados. Provavelmente essa cor se dá a algum tipo de contaminante que o microrganismo não degrada e então, houve a pouca percepção da degradação de forma qualitativa.

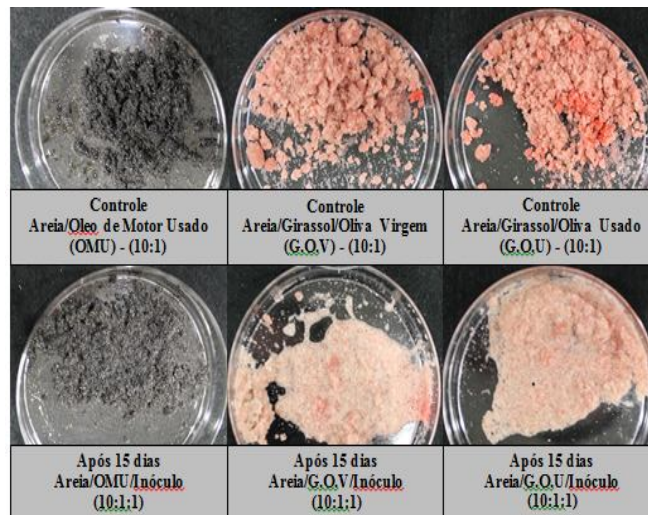


Figura 37 - Degradação em placas de areia contaminada com Óleo de Motor Usado, Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80:20) virgem e Mescla Óleo de Girassol/Oliva (80:20) usado por inóculo de *Bacillus sp.* ICA56.

5.3.11. Produção de Enzimas

Existe grande discussão e muitas pesquisas sobre a produção de enzimas do tipo amilases e proteases por bactérias do gênero *Bacillus sp.* No entanto, não é muito discutida a produção simultânea das mesmas na literatura. Um meio de cultivo que propicie a obtenção destas duas enzimas significa simplificação, rapidez e economia do processo (CORRÊA, 2009).

Amilases são enzimas empregadas na hidrólise completa do amido em maltooligossacarídeos. As proteases atuam sobre proteínas gerando oligopeptídeos e aminoácidos. Tais enzimas são de grande interesse industrial e produzidas em larga escala, principalmente por bactérias do gênero *Bacillus sp.* (Mabrouk, *et al.*, 1999; Mehrotra, *et al.*, 1999; Schallmeyer *et al.*, 2004). Amilases e proteases movimentam aproximadamente 90% do mercado mundial de enzimas (Banerjee *et al.*, 1999; Van der Maarel *et al.*, 2002; Merheb *et al.*, 2007). Podem ser aplicadas em diversos setores industriais como indústria de alimentos, detergente, papel e celulose, têxtil, farmacêutica e de química fina (ANWAR & SALEEMUDIN, 1998; KUMAR e TAKAGI, 1999; KIRK *et al.*, 2002, GUPTA *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003; KANDRA, 2003).

Faz-se necessária a atuação de várias enzimas pertencentes ao grupo das amilases para que a hidrólise do amido seja completa (HAKI & RAKSHIT, 2003). Estas enzimas liberam maltooligossacarídeos e glicose após a amilólise (KANDRA, 2003; CORRÊA, 2009).

Avaliou-se ainda a produção de Lipase. As lipases são enzimas definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) que catalisam a hidrólise das ligações ésteres de triacilglicerídeos insolúveis, liberando ácidos graxos livres, mono ou diacilglicerídeos na interface óleo-água (JAEGUER; REETZ, 1998; WAKELIN; FORSTER, 1997). Grande variedade de bactérias, fungos e leveduras produzem lipases. É interessante a produção em escala industrial de lipase por determinado microrganismo se a enzima possuir elevada atividade lipolítica.

As proteases, conhecidas também como peptidases ou enzimas proteolíticas, clivam proteínas em oligopeptídeos ou aminoácidos livres por meio da hidrólise de ligações peptídicas (SOOKKHEO *et al.*, 2000 e ALBERTS *et al.*, 2004). A proteólise enzimática associa-se a digestão de proteínas, despertando grande interesse no processo de digestão das mesmas nos animais e no homem (BEYON, 1996; GIONGO, 2006). São classificadas bioquimicamente pela União Internacional de Bioquímica (IUB) em seis famílias, de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e com sua especificidade ao substrato. Cada família de protease possui resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo (BEYON, 1996; GIONGO, 2006).

A Figura 38 representa a avaliação qualitativa para a produção das enzimas Amilase, Protease e Lipase.



Figura 38 - Avaliação qualitativa da produção de enzimas amilase, protease e lipase pelo microrganismo ICA56, incubado em placas petri com meios adequados para a produção das respectivas enzimas, a 30°C, por 48 horas.

Percebe-se pelas Figuras, a produção de amilase pela formação do halo amarelo revelado com iodo sublimado. Para protease, o halo é opaco. Para lipase, há crescimento bacteriano e deveria ter formação de halo ao redor das colônias. Como existe a presença de muitas colônias, houve dúvida em confirmar se houve produção de lipase. Realizou-se teste para confirmar se havia atividade lipásica. Adicionou-se 1,0 mL de meio de cultivo fermentado por ICA56, em uma emulsão de tributirina 1% V. A atividade lipásica é medida em pH 7,0. A concentração de NaOH utilizada foi 0,05 mol/L. No entanto, não se obteve resultado positivo.

5.3.12. Caracterização do Biossurfactante Produzido por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há mais de 10 anos na identificação em campo de substâncias desconhecidas. A tecnologia FTIR permite uma rápida avaliação e identificação de uma grande variedade de produtos químicos. A análise foi realizada em um equipamento Jasco – FTIR/6200, Acumulação: 100 scans; Resolução: 2 cm⁻¹; Janela espectral: 400-4000 cm⁻¹; Detector: TGS (triglycine sulfato). Foram feitas pastilhas brometo de potássio com o biossurfactante liofilizado para realização da análise. A Figura 39 apresenta os resultados obtidos para os espectros de surfactina padrão (Sigma Aldrich) e biossurfactante produzido por ICA56.

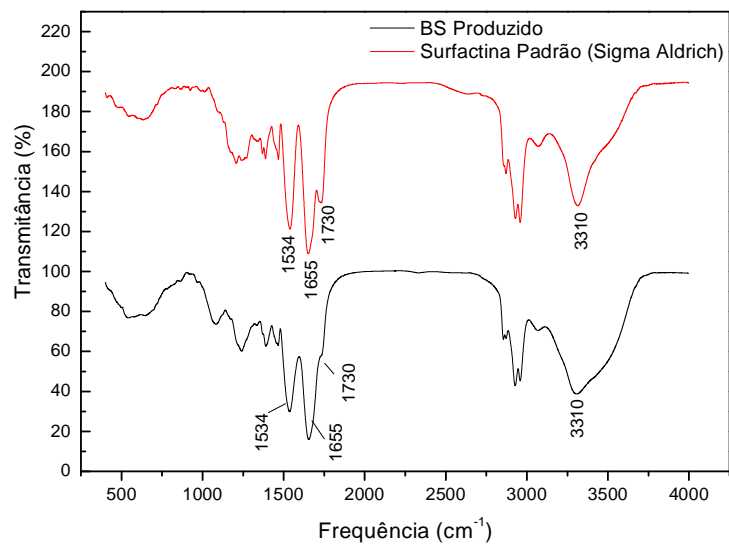


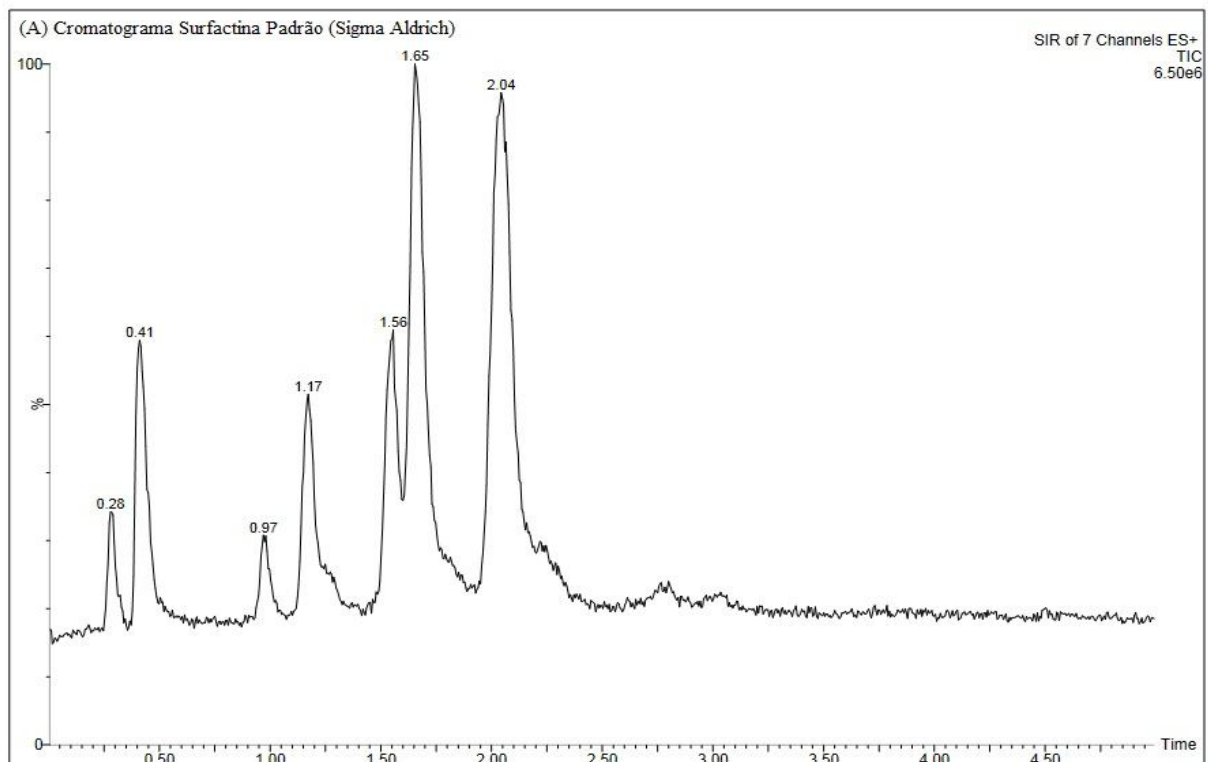
Figura 39 - FTIR - Espectrogramas vibracionais na região do infravermelho para surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina dialisada e liofilizada, produzida extracelularmente a partir da cultura de ICA56 cultivada em meio mineral, 30°C e 150 rpm, 48 horas.

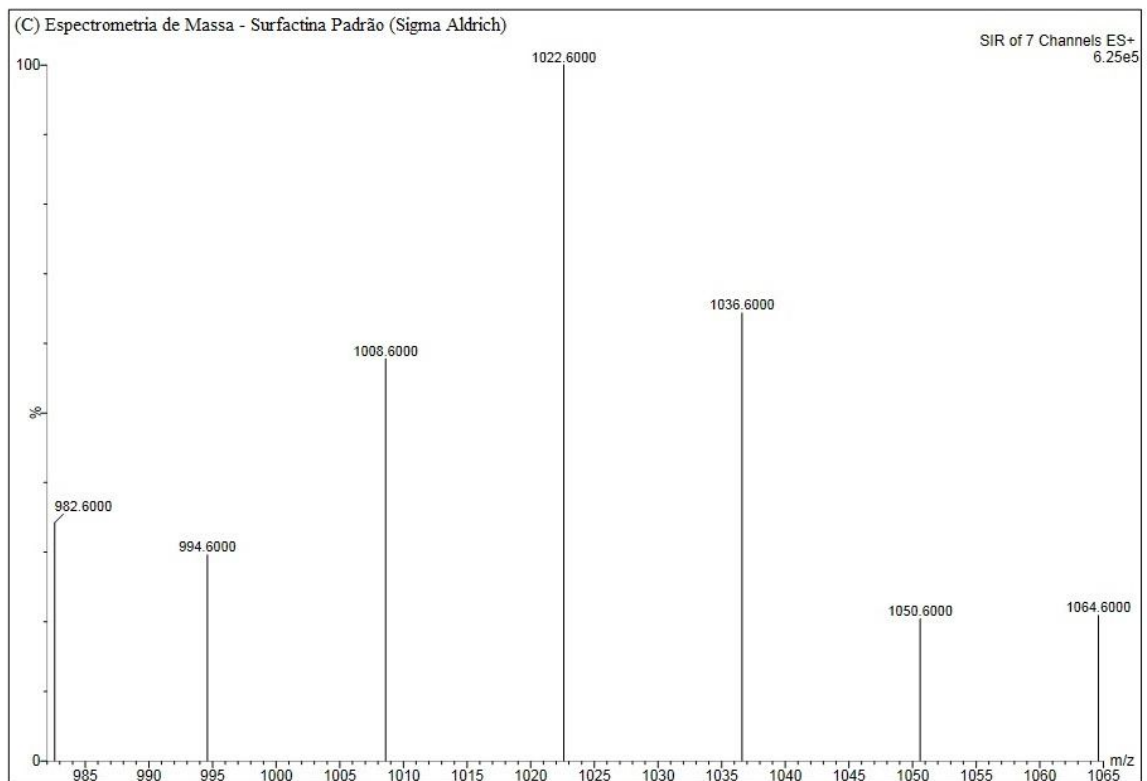
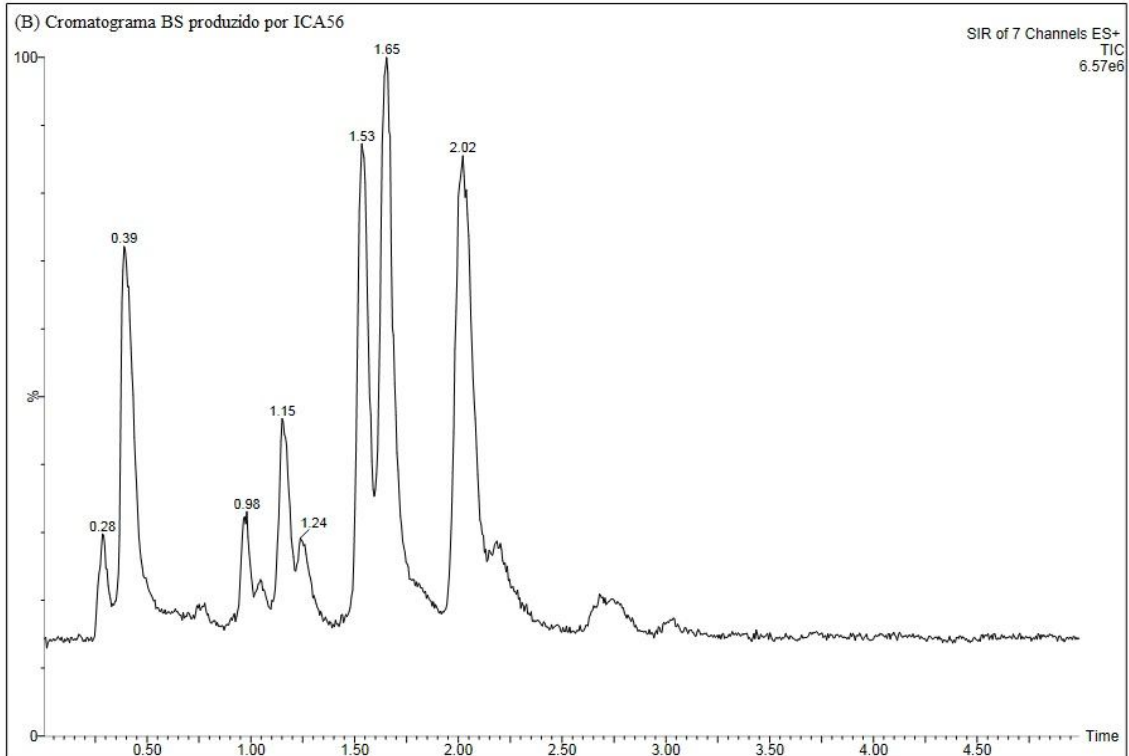
Observa-se que os resultados obtidos dos espectros vibracionais na região do infravermelho (FTIR) da surfactina padrão (Sigma Aldrich) e surfactina purificada produzida extracelularmente a partir da cultura de ICA56 se sobrepõem bem, indicando que o produto obtido no processo fermentativo é realmente um lipopeptídeo do tipo surfactina. Assim como para espectros realizados para o bioproduto excretado por *Bacillus subtilis* LAMI005 (citado em 5.1.6), observa-se características de peptídeos, nas quais as bandas identificadas indicam as seguintes ligações: 3430: NH, 1655: CO, 1534:CN e canais alifáticos (3000-2800, CH₂ e CH₃), indicando que esse composto é um lipopeptídeo. Também foi observada uma banda correspondente ao grupo carbonil ester (1730:CO). Observou-se resultados similares por Lin *et al.* (1994), quando determinou a estrutura química do surfactante produzido por *Bacillus licheniformis*. Não foi observada diferença significativa entre os espectros IR da surfactina semipurificada produzida extracelularmente a partir da cultura de ICA56 e surfactina padrão (Sigma Aldrich) no presente estudo.

5.3.13. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (Mass Spectrometry, MS) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra,

capaz de fornecer informação sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (CHIARADIA *et al.*, 2008; Gris, 2010). As análises foram realizadas em um cromatógrafo UPLC Waters Acquity H-Class, acoplado com uma coluna Waters UPLC BEH C-18 100 nm, operando a 40°C. O modo de trabalho é em SIR (Selected ion recording), ou seja, o espectro de massa detecta somente moléculas com peso molecular indicado. Os pesos moleculares foram: 982,60, 994,60, 1008,60, 1022,60, 1036,60, 1050,60 e 1064,60, correspondentes aos identificados na surfactina padrão. O método SIR facilita a identificação, uma vez que tínhamos a amostra padrão e diante disso, necessitaríamos apenas identificá-la previamente e posteriormente inserir amostra produzida por ICA56 e verificar se as moléculas identificadas na padrão repetiam-se no bioproduto, confirmando assim presença de surfactina. A Figura 40 (A, B, C, D) apresenta os cromatogramas e espectrogramas com os picos de retenção e pesos moleculares em contrados para a surfactina padrão (Sigma Aldrich) e para a amostra de biosurfactante produzida por ICA56. Verificou-se que os pesos moleculares encontrados na amostra padrão repetem-se na amostra produzida nos mesmos tempos de retenção.





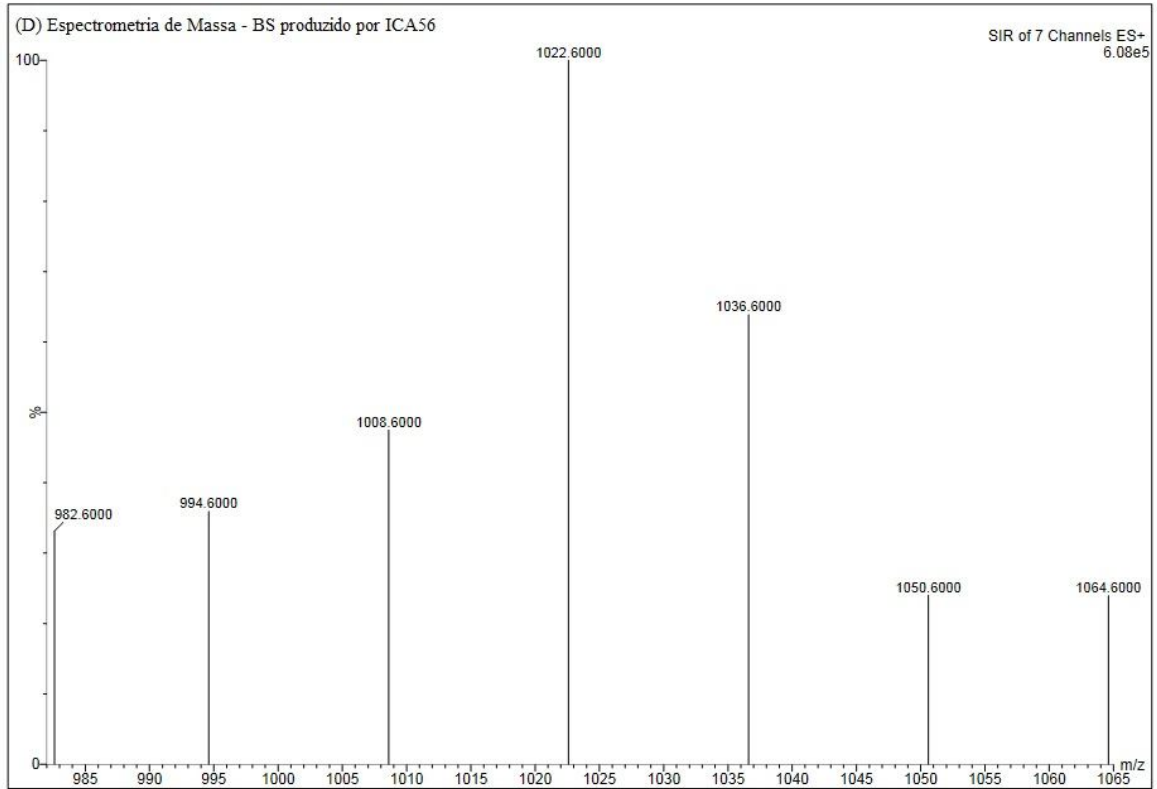


Figura 40 - Cromatogramas e espectrogrmas de massa para surfactina padrão e biossurfactante produzido por ICA56. (A) Cromatograma Surfactina Padrão (Sigma Aldrich); (B) Cromatograma BS produzido por ICA56; (C) Espectrometria de Massa - Surfactina Padrão (Sigma Aldrich); (D) Espectrometria de Massa - BS produzido por ICA56.

Capítulo 6: Conclusões

As principais conclusões do presente estudo são descritas a continuação.

(a) Em relação aos ensaios realizados com *Bacillus subtilis* LAMI005, conclui-se que:

- ✓ Nas condições experimentais empregadas, o microorganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 foi capaz de produzir biossurfactante, alcançando concentrações de até 225 mg/L em pH 6,0 e 275 mg /L em pH 7,0;
- ✓ Em todas as condições estudadas, a produção de biossurfactante foi acompanhada de uma redução nos valores da tensão superficial do meio líquido (valores em torno de $28,3 \pm 0,3$ mN/m;
- ✓ A adaptação do microrganismo desde a placa de repique contendo a mesma composição do meio de cultivo apresentou resultados relevância para a otimização da produção em função do tempo, com maior formação de produto ($114,57 \pm 0,21$ g.L⁻¹ em 24 horas e $70,63 \pm 0,09$ g.L⁻¹ em 72 horas) e consumo de substrato quando comparado ao uso da tradicional placa APGE;
- ✓ O microorganismo demonstrou capacidade de emulsionar diversos hidrocarbonetos como óleo de soja, querosene e n-hexadecano com IE₂₄ superiores a 60%;
- ✓ Os espectros vibracionais na região do infravermelho (FTIR) obtidos de amostras do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 e da surfactina padrão (Sigma Aldrich, 95% de pureza) apresentou características de peptídeos, nas quais as bandas identificadas indicam as seguintes ligações: 3430:NH, 1655:CO, 1534:CN e canais alifáticos (3000-2800, CH₂ e CH₃), indicando que esse composto é um lipopeptídeo. Também foi observada uma banda correspondente ao grupo carbonil ester (1730:CO)

(b) As principais conclusões relativas aos testes realizados com *Bacillus sp* Jag248 são as seguintes:

- ✓ Os testes realizados indicam uma clara a produção de surfactina, alcançando valores de concentração de até $161,41 \pm 0,01$ mg/L em meio mineral (MM); dita produção foi acompanhada de uma redução nos valores de tensão superficial de 28,50 mN/m;
- ✓ O biossurfactante produzido foi capaz de emulsionar óleo de soja, n-hexadecano e querosene com emulsões, apresentando valores de IE₂₄ em torno de 50%;

(c) No que se refere ao *Bacillus sp Jag249*:

- ✓ Nas condições testadas, verificou-se que o mesmo não foi capaz de reduzir a tensão superficial dos meios de cultivo estudados, e por tanto, não existem evidências de produção de biossurfactante.
- ✓

(d) Em relação às cepas **ICA12**, **ICA24** e **ICA56**, conclui-se que:

- ✓ As cepas foram capazes de reduzir significativamente a tensão superficial dos meios em que foram cultivadas para até $28,25 \pm 0,4$ mN/m;
- ✓ Dentre as cepas estudadas a que apresentou maior concentração de surfactante em meio mineral adicionado de solução de micronutrientes e inóculo LB Broth foi ICA56 ($329,14 \pm 0,00$ mg/L) seguida da cepa ICA12 ($253,32 \pm 2,04$ mg/L) em meio mineral adicionado de solução de micronutrientes e logo ICA24 ($111,87 \pm 0,00$ mg/L) em meio contendo suco de caju clarificado. No entanto, escolheu-se apenas ICA56 para dar continuidade aos estudos;

(e) As principais conclusões obtidas nos estudos realizados com a cepa **ICA56** são as seguintes:

- ✓ Nas condições experimentais empregadas, verificou-se a que microrganismo foi capaz de produzir biossurfactante;
- ✓ A estrutura química do BS foi caracterizada mediante técnicas de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Massa (SM), sendo indentificado como surfactina;
- ✓ O biossurfactante produzido por ICA 56 apresentou um importante poder de redução das tensões superficial e interfacial, com valores de $28,20 \pm 0,07$ mN/m (TS) e $05,26 \pm 0,08$ mN/m (IT - $3 \times \text{CMC}$ - 65°C);
- ✓ De forma geral, observa-se que os valores de tensão interfacial (solução de biossurfactante frente à dodecano) diminuem com o aumento de temperatura (intervalo de 25 a 65°C) e de concentração do bioproduto (20, 40 e 60 mg/l de BS);
- ✓ Os valores de concentração micelar crítica do biossurfactante foram determinados a diferentes temperaturas (25, 45 e 65°C), sendo que os valores de CMC variam entre 0.017 ± 0.002 mN/m (25°C) e 0.031 ± 0.008 mN/m (65°C);

- ✓ Verificou-se o aumento de concentração do biossurfactante (20, 40 e 60mg/L) repercute em uma redução dos valores de ângulo de contato entre soluções de BS e Parafilm© a 25°C (de 104.37 ± 4.31 , a 25°C, para 92.07 ± 1.55 , a 65°C);
- ✓ Verificou-se que o biossurfactante produzido por ICA56 apresentou alta biodegradabilidade, sendo degradado tanto por bactérias presentes em águas de efluentes residuais (população mista e aerada proveniente de uma depuradora da cidade de Granada– Espanha), como por *Pseudomonas putida*;
- ✓ Utilizando-se bactérias presentes em águas de efluentes residuais observou-se que, para todas as concentrações testadas (de 10 a 200 mg/L), os porcentagens de degradação do biossurfactante superaram os 50% e 90%, para ensaios com duração de 100 e 300 horas, respectivamente;
- ✓ Nos testes de biodegradação realizados com *Pseudomonas putida*. o parâmetro B50 (equivalente a 50% de biodegradação) corresponde a uma concentração de 122,1 mg/L de biossurfactante. Sendo assim, conclui-se que o biotensoativo produzido por ICA56 causa baixa inibição da atividade metabólica das bactérias, já que as mesmas são capazes de alimentarem-se de altas concentrações do tensoativo sem chegar a morrer;
- ✓ O biossurfactante produzido apresenta baixa toxicidade frente a diferentes organismos marinhos, como microalgas (*Selenastrum capricornutum*), microcrustáceos (*Daphnia magna*) e uma bactéria (*Vibrio fischeri*). Os organismos testados apresentaram EC50 de 65,03 mg/L (*Selenastrum capricornutum*), 170,09 mg/L (*Daphnia magna*) e 912,35 mg/L (*Vibrio fischeri* - após 15 minutos de exposição). Os organismos mais sensíveis testados foram as microalgas, em segundo lugar os microcrustáceos e em terceiro a bactéria;
- ✓ Nos ensaios de lavado de solos contaminados com óleo de motor observou-se que tanto a temperatura (intervalo de 25 a 65°C), como a concentração de biossurfactante (20 mg/L a 60 mg/L), exercem um efeito significativo sobre a eficácia do processo;
- ✓ Em testes de descontaminação de solos, valores elevados de eficiência de remoção do contaminante (ao redor de 85%) foram obtidos usando uma solução com 60 mg/L do biossurfactante e uma temperatura de 65°C;
- ✓ Em testes qualitativos, visualizou-se eficiente degradação de petróleo e mesclas de óleo de girassol e oliva (virgem e usado) pelo microrganismo ICA56;
- ✓ Em quanto à produção de enzimas, testes qualitativos realizados com o meio fermentativo ao final do processo de produção de BS indicam que, nas condições

experimentais, o microorganismo foi capaz de produzir enzimas dos tipos amilases e proteases.

Capítulo 7: Referências Bibliográficas

"*Daphnia magna*". Integrated Taxonomic Information System. Straus, 1820; Taxonomic Serial No.: 83884.

"Espectrometria de Massa". TrabalhosFeitos.com. 09/2013.
<<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Espectrometria-DeMassa/38896399.html>> PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124802/CA. Acessado em 14.06.2014.

ABD-ALLAH, AMA. Determination of long chain alkylbenzenes in sediment samples from Alexandria Coast, Egypt. *Toxicol. Environ. Chem* 47:83–88, 1995.

ABDEL-MAWGROUND, A. M.; LÉPINE, D, E.; Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 86, p. 1323 – 1336, 2010.

ABEL, P. D. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J Fish Biol.*, v. 6, p. 279 - 298, 1974.

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

AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, v. 6, n. 17, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, G. 27p., 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, G. 27p., 2004.

ALTMAYER VAZ, D., GUDIÑA, E.J., JURADO ALAMEDA, E., TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, L.R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167-174, 2012.

ALVES, O. L. "Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier: Feliz combinação de velhos conhecimentos de óptica, matemática e informática." Unicamp, Campinas, 2009.

ANKLEY, G. T.; BURKHARD, L. P. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ Toxicol Chem.*, v. 11, p. 1235 - 1248, 1992.

ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações. In: Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. São Carlos: RiMa, p. 117-147, 2006.

BANAT, I. M. Biosurfactant. v. 141, p. 198, 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. 1-12, 1995.

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**, 87:427-444, 2010.

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

BANERJEE, U. C., SANI, R.K., AZMI, W., SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 213-219, 1999.

BARRETO, R. V. G. Prospecção ambiental de microrganismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) - **Universidade Estadual do Ceará**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2011.

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

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

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. In: Fundamentos de toxicologia. Avaliação da toxicidade. **São Paulo**, v.2, p. 57-68, 2003.

BECHER, P. Emulsion. Theory and Practice. Second ed. Reinhold Publishing . **New York**. 1965.

BEYNON, R. J. Proteolytic Enzymes: a practical approach. New York. **Oxford University**. Press, 257 p., 1996.

BEZERRA, M. S. Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Departamento de Engenharia Química, Brasil, 2006.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, G. R.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E.R. Produção de Biotensoativo Utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) e Resíduo Agroindustrial (manípueira) como Substrato. **HOLOS**, Ano 28, v.1, 2012.

BODOUR, A.A.; GUERRERO-BARAJAS, C.; JIORLE, B.V.; MALCOMSON, M.E.; PAULL, A.K.; SOMOGYI, A.; TRINH, L.N.; BATES, R.B.; MAIER, R.M. Structure and

characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium sp.* strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 114-120, 2004.

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

BORGES, C. N. B. F. Estudo do factor envelhecimento na classificação geográfica automática de ramas petrolíferas. Dissertação de Mestrado, **Universidade de Lisboa**, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, 115 p., 2007.

BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. Química Geral. Rio de Janeiro: **Livros técnicos e científicos**, 1ª edição, 1981.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. O estudo no rio Mogi-Guaçu: a abordagem metodológica. In: Limnologia fluvial. **São Paulo**, v.1, p. 15-22, 2003.

BUENO, S.M.; SILVA, A.N.; GARCIA-CRUZ, C.H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v.33 no.7, São Paulo, 2010.

BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: Estudos de produção e caracterização. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 82 p., 2009.
SANTOS, C.F.C. Produção, purificação e caracterização de biossurfactante produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis*. Tese (Doutorado), 214 p., **Campinas**, 2001.

CARA, A. B. Influência de los procesos de ozonización sobre la biodegradación y toxicidad de tensioactivos no iónicos y aniónicos. Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, **Trabajo Final del Máster Universitario en Ciencia e Tecnología de Coloides y Interfases**, Universidad de Granada UGR, 2012.

CHATURVEDI, V.; KUMAR, A. Bacterial utilization of sodium dodecyl sulfate. **International Journal of Applied biology and pharmaceutical technology.**, v. 3, p. 1126 - 113, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.

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

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

CORRÊA, T. L. R. Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus sp.* Smia-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Centro de Ciências e

Tecnologias Agropecuárias, **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, Campos Dos Goytacazes – Rj, (Dissertação – Mestrado), 2009.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants, **Process. Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties. **Bioresource Technology**, 100, 4887–4890, 2009.

DECESARO, A.; RIGON, M.R.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

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

DESCHENES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J.P.; SAMSON, R. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 638 - 646, 1996.

DIAMANTINO, T.C.; GUILHERMINO, L.; ALMEIDA, E.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. **Ecotox Environ Safety**, v. 45, p. 253-259, 2000.

DUBEY, K.V. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 860-867, 2005.

ESMERALDO, F. S., Influência da Temperatura na Produção de Surfactina por *Bacillus Subtilis* LAMI005. *Monografia* (Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2010.

FARIA, A. F. Produção, Purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual. Tese de Doutorado, **Universidade Estadual de Campinas**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de AlimentosBrasil, 153 p., 2010.

FAVA, F.; DI GIOIA, D. Effects of Triton X-100 and quillaya saponin on the ex situ bioremediation of a chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 623-630, 1998.

FERNANDES, A. C. L. B.; PEREIRA, M. D. ; KRONEMBERGER, F. A.; FREIRE, D. M. G. Produção de biossurfactantes para aplicação em remediação de solos contaminados por

Petróleo: estudo dos fatores de virulência. In: **RIO OIL & GAS Expo and Conference, 2008**, Rio de Janeiro - Rio de Janeiro. RIO OIL & GAS Expo and Conference, 2008.

FERNANDES, P. L. Produção de biossurfactantes por *Bacillus spp.* em condição anaeróbia. **Dissertação de Mestrado** (Microbiologia Agrícola) - Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **TIBTECH**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **Tibtech**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por leveduras. **Química Nova**, v. 31(8), p. 2091-2099, 2008.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRANÇA, I. W. L., APOLONIO, J. A. M., BEZERRA, D., OLIVEIRA, D. W.F., MELO, V. M., GONCALVES, L. R.B. Estudo da Aplicabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em Biorremediação *in situ*. **6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás**, SC, 2011.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I.M. Application of biological surface active compounds in remediation technologies. In: Sen, R. (Ed.), **Biosurfactants: advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 672. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 14 p., 121–134, 2010.

GARRUTI, D. S.; CASIMIRO, A. R. S.; ABREU, F. A. P. **Processo Agroindustrial: Elaboração de Fermentado de Cajú**. Comunicado Técnico on line, 82, ISSN 1679-6535. Embrap, 2003.

GIONGO, R. J. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* (Dissertação de Mestrado). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 95 p., 2006.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 738–747, 2009.

GREENE, D.W.; BUKOVAC, M. Stomatal penetration: effect of surfactants and role in foliar absorption. **American Journal of Botany**, Columbus, v.61, n.1, p.100-106, 1974.

GRIS, E. F. Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim - SC – Brasil. Tese (doutorado) - **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 2010.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWANI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HAIGH, S.D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Science Total Environmental**, 185, 161-170, 1996.

HAKI, G.D., RAKSHIT, S.K. Developments in industrially importante thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1975.

HECULANO, J., ETCHEGARAY, A. J. Biossntese e Propriedades de Lipopeptídeos de *Bacillus subtilis* Produzidos em Meios de Cultura Alternativos. **Anais do XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas**, 2011.

HINZEL, W. L. Solution Chemistry of Surfactants. **Mittal, K. L. Ed. Plenum Press: New York**, 1979.

HOROWITZ, S.; CURRIE, J. K. Novel dispersants of silicon carbide and aluminum nitride. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 11, p. 637-659, 1990.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W.M. Isolation and chracterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 6 (4), p. 243-248, 1990.

HWANG, H.; ALEGRE, G. F.; BORELLY, S. I.; FLYNN, M. N. Avaliação de Toxicidade em Sedimentos do Rio Juqueri (SP) com *Vibrio fischeri* e *Hyaella azteca*. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 2, p. 18-28, 2009.

IQBAL, S., KHALID, Z. M., MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactant by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letter and Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends and Biotechnology**, Amsterdã, v. 16, n.9, p. 396-403, 1998.

JURADO, E.; FERNAHDEZ-SERRANO, M.; NDFIEZ-OLEA, J.; LECHUGA, M. Primary Biodegradation of Commercial Fatty-Alcohol Ethoxylate Surfactants: Characteristic Parameters. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 10, p. 145-153, 2007.

KAISER, K. L. E.; PALABRICA, V. S. Photobacterium phosphoreum Toxicity Data Index. **Water Pollut. Res.**, v. 26 (9), p. 361-431, 1991.

KANDRA, L. α -amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, p. 666-667:487-498, 2003.

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, n. 1, p. p. 41-46, 1997.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249 - 253, 2010.

KIRAN, S.G.; THOMAS, T.A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, 101, 2389-2396, 2010.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Biosurfactants and biotechnology. **Surfactant Science Series**, v. 25, p. 247-331, 1987.

KUMAR, C.G., TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LEWIS, M. A. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. **Water Research**, v. 25, p. 101 - 113, 1991.

LIMA, C. J. B. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. Tese (doutorado), **Universidade Federal de Uberlândia**, programa de Pós Graduação em Engenharia Química, 2007.

LIMA, L. B. Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopetídicos em sedimentos de manguezais do Ceará. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, **Universidade Federal do Ceará**, 54 p., 2013.

LIMA, R. K. C. Estudos de Composição e Estabilidade de Emulsões Preparadas a Base de Óleo Mineral Naftênico. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, **Universidade Federal do Ceará** (UFC), Fortaleza – Ceará, 2004.

LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. Tese de Doutorado, **Universidade Federal de Viçosa**, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, 157 p., 2008.

MABROUK, S.; HASHEM, A.M.; EL-SHAYEB, N.M.A.; ISMAIL, A.S.; ABDEL-FATTAH, A.F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v. 69, p.155-159, 1999.

MADSEN, T.; PETERSEN, G.; SEIERO, C.; TORSLOV, J.; J. Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate. **American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 7, p. 929-933, 1996.

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

MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. An update 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. Effects of Various Nutritional Supplements on Biosurfactant Production by a Strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 5, p. 11-17, 2002.

MARTÍN, G. R. Compuestos orgánicos en las aguas. **Engeniería Química**, v. 6, p. 159-165, 1995.

MARTINS, D.; CARBONARI, C.A.; TERRA, M.A.; MARCHI, S.R. Ação de adjuvantes na absorção e translocação de glyphosate em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*). **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.27, n.1, p.155-163, 2009.

MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GAUR, R., DARMWAL, N.S. The production of alkaline protease by *Bacillus* species isolate. **Bioresource Technology**. V. 67, p. 201-203, 1999.

MELO, C.S.; MAYORGA, R.D.; MAYORGA, I. O.; PAULA PESSOA, P.F.A. Subsídios à gestão empresarial na busca de competitividade: o caso do mel clarificado de caju. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 31, n. 4, p.1050-1058, 2000.

MELO, C.S.; MAYORGA, R.D.; MAYORGA, I. O.; PAULA PESSOA, P.F.A. *Subsídios à gestão empresarial na busca de competitividade: o caso do mel clarificado de caju*. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 31, n. 4, p.1050-1058, 2000.

MENDONÇA, C.G.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; MENDONÇA, C.G. Efeitos de surfatantes sobre a tensão superficial e a área de molhamento de soluções de glyphosate sobre folhas de tiririca. **Planta Daninha**, Viçosa - MG, v.13, n.3, p.355-365, 1999.

MERCADE, M. E., MANRESA, M. A., ROBERT, M., ESPUNY, M. J., ANDRES, C., GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME): new substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 1-6, 1993.

MERHEB, C.W., CABRAL, H., GOMES, E., DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127–131, 2007.

- MITRA, S.; DUNGAN, S. Micellar properties of Quillaja saponin. 1. Effects of temperature, salt and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.5, p.1587-1595, 1997.
- MOHAN, P. K., NAKHLA, G. AND YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Resource**, v. 40, p. 533-540, 2006.
- MOITA NETO, J.M. *Molhamento e ângulo de contato*. março de 2006. Teresina: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/Molhamento.PDF>>.
- MOLINA-BARAHONA, L., VEGA-LOYO, L., GUERRERO, M., RAMIREZ, S., ROMERO, I., VEGA-JARQUÍN, C., & ALBORES, A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. **Environmental toxicology**, v. 20(1), p. 100-109, 2005.
- MONTGOMERY**, D.C. Design and Analysis of Experiments. **John Wiley & Sons**, 2012.
- MORÁN, A.C., OLIVERA, N., COMMENDATORE, M., ESTEVES, J.L., SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, p. 65-71, 2000.
- MORAN,A.C.; OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SENERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9, **Biodegradation**, v.11, p. 65-71, 2000.
- MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, T.; IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. **Journal of Bacteriology**, n. 175, p. 6459-6466, 1993.
- MOYA-RAMÍREZ, I.; GARCÍA-ROMÁN, M.; HENARES-JIMÉNEZ, M.; JURADO-ALAMEDA, E.; ALTMAJER-VAZ, D. Remediación de suelos contaminados con aceite mineral mediante tensioactivos altamente biodegradables. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, in press, 2014.
- MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 479 – 489, 2005.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science** (00113891), v. 94, n. 6, 2008.

NGUYEN, T.T.; YOUSSEF, N.H.; MCINERNEY, M.J.; SABATINI, D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, v. 42, p. 1735–1743, 2008.

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

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 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, n. 2, p. 336-341, 2006.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 485–489, 1990.

OLIVEIRA, D. W. F. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Ceará - UFC**, Fortaleza, Brasil, 104 f., 2010.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FELIX, A. K. N.; APOLÔNIO, J. M. A.; BEZERRA, D. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. G. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005: Avaliação do Meio de Cultivo. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM 2011)**, Caxias do Sul – RS, 2011.

ORLANDELLI, R. C.; ALMEIDA, T. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum Sw.* **VII Encontro Internacional de Produção Científica CESUMAR (VII EPCC)**, ISBN 978-85-8084-055-1, 2011.

PACWA-PLÓCINICZA, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-654, 2011.

PAIXÃO, J. F.; NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; REZENDE, A. Avaliação da toxicidade do fenol e 4-clorofenol para a microalga *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae, Tetraselmidaceae). In: **VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Vitória-ES. Livro de Resumos, p. 260, 2002.

PENFOLD, J.; THOMASB, R. K.; SHENC, H-H. Adsorption and self-assembly of biosurfactants studied by neutron reflectivity and small angle neutron scattering: glycolipids, lipopeptides and proteins. **Soft Matter**, v. 8, p. 578–591, 2012.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. K. N. Timmis

(ed.), **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 09 p., 1502-1510, 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

PIRÔLLO, M.P.S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, **Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro – São Paulo**, 2006.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery, **iochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 172–179, 2008.

PRUTHI, V. AND CAMEOTRA, S.S. Effect of Nutrients on Optimal Production of Biosurfactants by *Pseudomonas putida* - A Gujarat Oil Field Isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; DE FRANÇA, F. P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* grown on Low-Cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 899-912, 2004.

RIETZLER, A. C.; PASQUAL, C. B.; LIMA, D.; FONSECA, A. L.; ESPÍNDOLA, E. I. G.; Anais do **5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia**, Itajaí, Brasil, 1998.

ROCHA, M. V. R.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural Cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L. R.; BANAT, IBRAHIM M.; MEI, HENNY VAN DER; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R.. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p. 470-480, 2006.

ROSEN, M. J. Surfactants and interfacial phenomena. **Ed. John Wilwy & Sons**, USA, 431 p., 1989.

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

RUFINO, R. D. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. *Dissertação de Mestrado* (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife – Pernambuco, 95f., 2006.

RUÍZ, F. R. Comportamiento Ambiental de Tensioactivos Comerciales. Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, **Trabajo Final del Máster Universitario en Ciencia e Tecnología de Coloides y Interfases**, Universidad de Granada UGR, 2010.

S.C. LIN, K.S. CARSWELL, M.M. SHARMA, G. GEORGIU. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 281–285, 1994.

Safra de caju 2013: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201404.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201404.pdf). 86 páginas. Acessado em 11 de junho de 2013.

SAMSON, R.; CSEH, T.; HAWARI, J.; GREER, C.W.; ZALOUM, R. Biotechnologies applique'es a` la restauration de sites contamine's avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contamine's par des BPC. **Science et Techniques de l'Eau**, v. 23, p. 15–18, 1990.

SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4585-4588, 2000.

SARMA, S. S.S.; MANGAS-RAMIREZ, E.; NANDINI, S. Effect of ammonia toxicity on the competition among three species of cladocerans (Crustacea: Cladocera). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 227-235, 2003.

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G., CHOPADE, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, Adv. 28, 436–450, 2010.

SCHALLMEY, M., SINGH, A., WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

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.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 141-148, 2004.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, n. 33, p. 163-184, 1995.

SHAHIDZADEH, N.; BONN, D.; MEUNIER, J.; NABAVI, M.; AIRIAU, M.; MORYAN, M. Dynamics of Spontaneous Emulsification for Fabrication of Oil in Water Emulsions. **Langmuir**, 16, p. 9703-9708, 2000.

SHARREL REBELLO; AJU K. ASOK; SATHISH MUNDAYOOR; M. S. JISHA. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. **Environmental chemistry letters** [1610-3653], 12 (2), p. 275 -287, 2014.

SHAW, D.J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry, **Butterworth-Heinemann**, Oxford, (4ª Ed.), 1992.

SILVA, C. R. R.; KIPERSTOK, A. Água produzida na extração de petróleo. Monografia, Escola politécnica - Departamento de hidráulica e saneamento, 2000.

SINGH, A., VAN HAMME, J. D. AND WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-122, 2007.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; RAY, A.; GUPTA, A.; SEN, R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. **Bioresource Technology**, 101, 2884–2887, 2010.

SKORNYAKOV, I. V.; TOLSTOROZHEV, G. B.; BUTRA, V. A. "Infrared Absorption Spectra of Human Malignant Tumor Tissues." **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 75, p. 420-425, 2008.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a General Overview. In Biosurfactants, Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, p. 1-11, 2011.
PACWA-PLOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633–654, 2011.

SOOKKHEO, B., SINCHAIKUL, S., PHUTRAKUL, S., CHEN, S.T. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. **Protein Expression and Purification**, v. 20, p. 142–151, 2000.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT IBRAHIM M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2010.08.099, (2010).

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **Fems Microbiology Letters**, v. 128, p. 101 - 106, 1995.

UNE 55-844-91 (NORMA UNE 55-844-91). Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.

UNE EN ISO 11348-2 (NORMA UNE EN ISO 11348-2). Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes).

UNE-EN 28692:1994 (NORMA UNE EN 28692:1994). Calidad del Agua: Ensaio de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con *Scenedesmus subspicatus* y *Selenastrum capricornutum*.

VALRAEDS-MARTINE, M.C.; VANDERMEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J.: Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 8, n.1, p. 51 - 61, 1996.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

VAN GINKEL, C.G. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. **Biodegradation**, v. 7, p. 151-164, 1996.

VAN OSS, C; GOOD, R.; CHAUDHURY, M. Additive and non additive surface tension components and its interpretation of contact angles, **Langmuir**, v. 4(4), p. 884-891, 1988.

Vibrio fischeri - imagem <<http://www.ou.edu/cas/botany-micro/faculty/dunn.html>>. Acessado em 14.06.2014.

VILLEGAS-NAVARRO, A.; GONZALEZ, M. C. R.; LOPEZ, E. R. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. **Environ. Internai**,v. 25, n. 5, p. 619-624, 1999.

VINCENT, J. M. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. **IBP Handbook**, n. 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

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**, n. 25, p. 289-297, 1997.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 59, n.1, p. 37-43, 1997.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 59, n.1, p. 37-43, 1997.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 724-728, 1998.

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

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

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

WEI, Y.H.; LAI, C.C.; CHANG, J.S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, ed. 1, p. 40-45, 2007.

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

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

YING. G. G. Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradacion products in the environment. **Environmental International**, v. 32, p. 417-431, 2006.

YUAN, Y.; LEE, T.R. Contact angle and wetting properties. In: Bracco B Holst, (eds.), Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, n. 51, p. 3-34, 2013.

ZEIRAK, A.E.; NITCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbiol**, n. 61, p. 554-559, 2010.

ZENG, X.T.; XU, Y.Z.; ZHANG, X.Q.; XU, Z.; ZHANG, Y.F.; WU, J.G.; ZHOU, X.S.; LING, X.F. "FTIR spectroscopic explorations of freshly resected thyroid malignant tissues", **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 27(12), p. 2422-2426, 2007.