



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES OBTIDOS A PARTIR DE
RESÍDUOS INDUSTRIAIS**

PAOLA CHAVES MARTINS

VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES OBTIDOS A PARTIR DE
RESÍDUOS INDUSTRIAIS

PAOLA CHAVES MARTINS
Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos para
obtenção do título de
mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos

VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

M386p Martins, Paola Chaves.
Produção e aplicação de biossurfactantes obtidos a partir de resíduos industriais / Paola Chaves Martins. – 2016
97 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

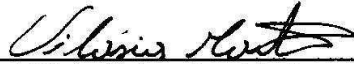
Orientadora: Dr^a. Vilásia Guimarães Martins.

1. Ionização 2. Tensão superficial 3. Atividade emulsificante
4. Remoção de corantes 5. Tintas I. Martins, Vilásia Guimarães
II. Título.

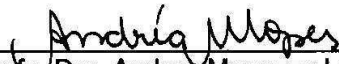
CDU 663.1

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Paola Chaves Martins e aprovada em 21 de março de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG



Profa. Dra. Andrea Menezes Lopes – FURG



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



Profa. Dra. Vanessa Sacramento Cerqueira – UFPEL

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Lourdes, e ao meu “namorado” Fernando, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a muitas pessoas importantes que passaram pela minha vida até este momento. Agradeço a **Deus** por me iluminar nos momentos que mais precisei.

Aos meus pais **Paulo** e **Lourdes** pelo amor e todo esforço que fizeram para que eu me tornasse o que sou. Tudo isso é graças a vocês e para vocês. Pai e Mãe vocês são a minha vida. Amo vocês muito!

Ao meu “namorado” **Fernando** por todo amor e compreensão, todos desafios que enfrentei ao teu lado foram muito mais fáceis. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, bons e ruins e sempre com muita paciência e amor. Minhas conquistas são tuas conquistas! Te amo muito!

Ao restante da minha família que participaram de alguma forma para que este e muitos momentos acontecessem. Principalmente, minha **Dinda Glória** que é muito importante na minha vida. Obrigada por tudo! Amo vocês!

A **Sole** por todo apoio, palavras de incentivo e por me ensinar diariamente o significado da vida, do amor e das pessoas que estão ao nosso redor. Te amo!

A minha orientadora **Dra. Vilásia Martins** por toda confiança que sempre depositou em mim, pela amizade, compreensão, aprendizado e disponibilidade em prestar qualquer auxílio independente do momento. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar 6 anos junto com você. Foi e continuará ser um prazer imenso.

Aos meus amigos **Felipe** e **Vane** pelo carinho, incentivo e principalmente por compreenderem minhas ausências em diversos momentos. Amo vocês!

Aos amados **Bisa** (*in memórium*) e **Chris** (*in memórium*) pelo carinho e amizade. A falta que vocês fazem dói, saudade e tristeza se confundem no vazio deixado. Amo vocês!

As minhas amigas da graduação **Andressinha, Ceci, Dani, Michele, Silvia** e **Simone** por todo carinho, incentivo e amizade. Embora a vida tenha nos mostrado rumos diferentes a amizade permanece. Amo vocês.

Aos meus companheiros de jornada no laboratório **Doug, Sibele, Ju, Michele Coelho, Daiane** e **Vivi Patrícia** pelo amor, risadas, amizade, auxílios e companheirismo. Meus dias foram mais leves e felizes com vocês ao meu lado. Nossa convivência se tornou uma grande amizade e sem vocês tudo seria mais difícil e triste! Obrigada por suportarem meu mau humor. Amo vocês muito!

A bolsista **Helen** por toda ajuda, amizade e disponibilidade. Obrigada parte deste trabalho também é sua.

A **Meri, Jã e Ina** por me acompanharem no LTA desde o início com muita paciência, amizade e companheirismo. Aprendi muito com vocês. Obrigada, amo vocês!

A **Sabrine** por toda PACIÊNCIA, amizade, carinho e dedicação em ajudar. Nunca negou ajuda mesmo quando os momentos eram os menos oportunos. Obrigada Sasa, tu és a melhor!
Te amo!

Aos demais colegas do LTA por sempre estarem ao meu lado, com muita paciência e amizade. Fui muito bem acolhida durante todos meus anos no laboratório.

A todos meus amigos que sempre compreenderam minhas ausências e estiveram ao lado em todos os momentos. Amo vocês.

Ao **Prof. Dr. Jorge Alberto Costa** por ceder seu laboratório para que parte deste estudo pudesse ser desenvolvido. Obrigada pela confiança.

Ao **Roque Zílio** pela disposição em ajudar, amizade e compreensão. Muito obrigada.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo incentivo, preocupação e auxílio.

A **Islanda** pela disponibilidade em sanar todas nossas dificuldades em todos os momentos.

Ao pessoal do Laboratório de Operações Unitárias pelo auxílio com a parte de adsorção de corante.

Também foram indispensáveis para realização deste trabalho:

A Universidade Federal do Rio Grande pelo espaço para o desenvolvimento deste trabalho.
Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG pelos equipamentos cedidos, disponibilidade e confiança.

A BS Bios que forneceu o glicerol.

A Empresa Pescal que cedeu o resíduo de Pescado.

A Refinaria Rio Grandense que forneceu o lodo de petróleo.

Aos Produtores de Santo Antônio da Patrulha pelo resíduo de cana.

Os professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos e auxílios durante o desenvolvimento do trabalho.

A FAPERGS pelo auxílio financeiro.

“O espírito sem limites é o maior tesouro do homem.”

J. K. Rowling

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos tenso-ativos que podem ser produzidos por diferentes tipos de bactérias e fungos. Além disto, os surfactantes biológicos podem ser utilizados no controle da poluição ambiental, como no processo de biorremediação de águas e solos, remoção de tintas e contaminantes hidrofóbicos, adsorção de metais, entre outros. Os biossurfactantes podem ser produzidos através da utilização de resíduos industriais, o que é uma alternativa para a utilização destes rejeitos e também diminui os custos de produção do bioproduto. Este estudo teve como objetivo a produção de biossurfactantes a partir de diferentes resíduos industriais bem como a sua aplicação na remoção de tintas e adsorção de corantes. Os biossurfactantes foram obtidos através de cultivo submerso a 30 °C por 72 h. O meio para o crescimento do micro-organismo foi composto por meio mineral e fonte de carbono, sendo estas, resíduo de pescado, bagaço de cana, glicerol e resíduo de tanque de armazenamento de petróleo. Os resíduos foram adicionados nas quantidades de 3, 5 e 7 %, os micro-organismos utilizados para a produção foram *Corynebacterium aquaticum* e *Corynebacterium spp*, os quais foram adicionados na proporção de 2 %. Para a avaliação do processo foram realizadas análises de tensão superficial, atividade emulsificante e pH. Também foram verificados o caráter iônico dos biossurfactantes. A estabilidade dos biotensoativos que apresentaram melhores propriedades tensoativas e emulsificantes foram verificadas em diferentes pHs, temperaturas e concentrações salinas. A estabilidade do biossurfactante após o processo de esterilização e o armazenamento dos biossurfactantes também foi verificada. Os biossurfactantes foram aplicados quanto a remoção de tinta do tipo esmalte sintético por um período de 15 dias e adsorção de corante vermelho 40 através da formulação de um filme de ágar 1 %, glicerol e biossurfactante. Em relação aos resultados, os biossurfactantes produzidos por ambas bactérias a partir de lodo e glicerol não apresentaram resultados expressivos. A produção de biossurfactantes por *Corynebacterium aquaticum* a partir de 3 % de resíduo de pescado obtiveram tensão superficial de 27,6 mN/m e atividade emulsificante de 87,6 %. Os biossurfactantes produzidos pelo mesmo micro-organismo utilizando bagaço de cana apresentaram dados de tensão superficial de 33,9 mN/m e atividade emulsificante de 61,6 % para a concentração de 3 % do resíduo. Sendo estes utilizados nas demais etapas do estudo. Em relação a verificação da estabilidade, os biossurfactantes produzidos por resíduo de pescado mostraram-se mais estáveis, em relação a todos parâmetros avaliados do que os biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana. Em relação a remoção de tinta, os biossurfactantes obtidos a partir de bagaço de cana mostraram maior capacidade de remoção de tintas da superfície. Por fim, o processo de adsorção de corante vermelho 40 não apresentou resultados satisfatórios, uma vez, que o filme padrão apresentou mesmo percentual de adsorção do que os filmes compostos por biossurfactantes. Os biossurfactantes que apresentaram as melhores características foram os produzidos por *Corynebacterium aquaticum*.

Palavras-chave: caráter iônico, tensão superficial, atividade emulsificante, remoção de tintas.

ABSTRACT

PRODUCTION AND APPLICATION OF BIOSURFACTANTS OBTAINED FROM INDUSTRIAL WASTE

Biosurfactants are surface-active compounds that may be produced by different bacteria and fungi. Furthermore, biological surfactants may be used to control environmental pollution, as in the bioremediation process of soils and waters, removing inks and hydrophobic contaminants, adsorption of metals, among others. The biosurfactants may be produced by using industrial waste, which becomes an alternative for the use of waste byproduct and decreases production costs. This study aimed to produce biosurfactants from different industrial waste and its application in the removal of paint and dye adsorption. The biosurfactants were obtained by submerged cultivation at 30 °C for 72 h. The medium for the growth of the microorganism was prepared using mineral medium and a carbon source, as fish waste, sugar cane bagasse, glycerol and oil storage tank residue. The residues were added in amounts of 3, 5 and 7 % and the microorganisms *Corynebacterium aquaticum* or *Corynebacterium spp* were added in the proportion of 2 %. For the evaluation of the biosurfactants production, the surface tension, emulsifying activity and pH analysis were conducted. The ionic character of biosurfactants and stability of biotensioativos that presented better surface-active and emulsifiers properties, at different pH, temperatures and salt concentrations, were evaluated. After the sterilization and storage process the stability of the biosurfactant was also observed. The biosurfactants were applied as synthetic enamel ink remover for a period of 15 days and adsorption of dye 40 red by formulating films 1 % agar, glycerol and biosurfactant. The results of the biosurfactants produced by both bacteria from petroleum sludge and glycerol did not show significant results. The biosurfactant production by *Corynebacterium aquaticum* from 3 % of fish residue showed surface tension of 27.6 mN/m and emulsifying activity 87.6 %. The biosurfactant produced by the same microorganism using sugar cane bagasse presented surface tension of 33.9 mN/m and emulsifying activity 61.6 % using 3 % of residue. These were used in the other stages of the study. For stability test, the biosurfactant produced by fish waste was more stable compared to all evaluated parameters of the biosurfactant produced from sugar cane bagasse. Regarding the removal of ink, the biosurfactant obtained from sugar cane bagasse showed a better ability to remove surface coatings. Finally, the adsorption process of dye 40 red did not provide satisfactory results. The biosurfactants that presented the best features were produced by *Corynebacterium aquaticum*.

Keywords: ionic character, surface tension, emulsifying activity, removal of ink.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de biossurfactantes	33
Tabela 2 – Composição proximal de resíduo de pescado de água salgada e doce	37
Tabela 3 – Exemplos das principais aplicações dos biossurfactantes	40
Tabela 4 – Composição proximal das matérias-primas.....	51
Tabela 5 – Tensões superficiais dos extratos contendo os biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i>	54
Tabela 6 – Tensões superficiais dos extratos contendo os biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium spp.</i> CCT 1968.....	57
Tabela 7 – Atividades emulsificantes obtidas durante os cultivos com a <i>Corynebacterium aquaticum</i>	60
Tabela 8 – Atividades emulsificantes obtidas durante o cultivo utilizando a <i>Corynebacterium spp.</i> CCT 1968.....	62
Tabela 9 – Propriedades dos biossurfactantes selecionados para a avaliação da estabilidade e armazenamento	69
Tabela 10 – Concentração de corante adsorvido em 100 mg de filme.....	83
Tabela 11 – Concentração de corante adsorvido em 200 mg de filme	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns tipos de biossurfactantes.....	28
Figura 2 – Modelo teórico para o cálculo da tensão superficial.....	38
Figura 3 – Extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de (a) resíduo de pescado, (b) bagaço de cana-de-açúcar, (c) lodo de petróleo e (d) glicerina bruta.....	52
Figura 4 – Extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium spp.</i> CCT 1968 a partir de (a) resíduo de pescado, (b) bagaço de cana-de-açúcar, (c) lodo de petróleo e (d) glicerina bruta.....	53
Figura 5 – Comportamento das tensões superficiais obtidas nos cultivos utilizando a <i>Corynebacterium aquaticum</i> (A) resíduo de pescado, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) lodo de petróleo e (D) glicerol.....	55
Figura 6 – Tensões superficiais obtidas durante os cultivos utilizando a <i>Corynebacterium spp.</i> CCT1968 (A) resíduo de pescado, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) lodo de petróleo e (D) glicerol.	58
Figura 7 – pHs medidos durante o cultivo utilizando <i>Corynebacterium aquaticum</i> e diferentes fontes de carbono.....	65
Figura 8 – pHs medidos durante o cultivo utilizando <i>Corynebacterium spp.</i> CCT1968 e diferentes fontes de carbono	66
Figura 9 – Imagens das placas utilizadas para a determinação do caráter iônico para os extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de (A) resíduo de pescado (RP), (B) glicerina bruta (GL), (C) bagaço de cana-de-açúcar (BC) e (D) resíduo de lodo de petróleo (LP)	67
Figura 10 – Imagens das placas utilizadas para a determinação do caráter iônico para os extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium spp.</i> CCT1968 a partir de (A) resíduo de pescado (RP), (B) bagaço de cana-de-açúcar (BC), (C) resíduo de lodo de petróleo e (D) glicerina bruta (GL).....	68
Figura 11 – Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de resíduo de pescado em diferentes pHs.....	70
Figura 12 – Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes pHs.....	71

Figura 13 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de resíduo de pescado em diferentes concentrações salinas.....	72
Figura 14 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações salinas	73
Figura 15 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de resíduo de pescado frente a diferentes temperaturas	74
Figura 16 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> a partir de bagaço de cana-de-açúcar frente a diferentes temperaturas	75
Figura 17 – Acompanhamento das tensões superficiais para os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado durante os tratamentos 1 e 2.	76
Figura 18 – Acompanhamento das tensões superficiais para os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar durante os tratamentos 1 e 2	78
Figura 19 – Placas de metal cobertas com tinta e imersas em (a) água, (b) solvente, (c) extrato do biossurfactante de resíduo de pescado e (d) extrato do biossurfactante de bagaço de cana-de-açúcar no tempo zero	79
Figura 20 – Placas de metal cobertas com tinta e imersas em (a) água, (b) solvente, (c) extrato do biossurfactante de resíduo de pescado e (d) extrato do biossurfactante de bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 1 dia	80
Figura 21 – Placas de metal cobertas com tinta e imersas em (a) água, (b) solvente, (c) extrato do biossurfactante de resíduo de pescado e (d) extrato do biossurfactante de bagaço de cana-de-açúcar no tempo 15 dias.....	80
Figura 22 – Placas de metal no momento da retirada após os 15 dias de processo. (a) Placa imersa em água, (b) placa imersa no solvente, (c) placa imersa no extrato do biossurfactantes de resíduo de pescado e (d) placa imersa no extrato do biossurfactantes de bagaço de cana-de-açúcar	81
Figura 23 – Tiras dos filmes produzidos utilizando o extrato do biossurfactante obtido a partir de resíduo de pescado, após o processo de adsorção	84
Figura 24 – Curva padrão do corante vermelho 40.....	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 BIOSSURFACTANTES	27
3.1.1 Propriedades dos biossurfactantes.....	29
3.2 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	30
3.2.1 Cultivo submerso	31
3.2.2 Micro-organismos produtores de biossurfactantes	32
3.2.3 Resíduos industriais utilizados como substrato	33
3.2.4 Avaliação da produção dos biossurfactantes	37
3.3 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	39
3.4 ATUALIDADES NA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 MATERIAL	43
4.2 MÉTODO	43
4.2.1 Caracterização da matéria-prima.....	43
4.2.2 Produção dos biossurfactantes	44
4.2.3 Avaliação dos biossurfactantes produzidos durante o cultivo	45
4.2.4 Determinação do caráter iônico dos biossurfactantes.....	45
4.2.5 Estabilidade dos biossurfactantes em diferentes condições.....	46
4.2.6 Armazenamento do meio de cultivo contendo os biossurfactantes.....	47
4.2.7 Aplicação dos biossurfactantes.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	51
5.2 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	52
5.2.1 Tensão superficial.....	53
5.2.2 Atividade emulsificante.....	59
5.2.3 Determinação do pH.....	64
5.2.4 Determinação do caráter iônico dos biossurfactantes.....	66
5.3 ESTABILIDADE DOS BIOSSURFACTANTES	69
5.3.1 Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes em diferentes pHs.....	69
5.3.2 Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes em diferentes concentrações salinas	71
5.3.3 Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes em diferentes temperaturas.....	73
5.4 ARMAZENAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVOS CONTENDO OS BIOSSURFACTANTES	75
5.5 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	78
5.5.1 Remoção de tintas.....	79
5.5.2 Adsorção de corantes.....	82
6 CONCLUSÃO.....	85

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO 1	97

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos químicos constituídos de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, apresentando, portanto, a capacidade de promover a diminuição de tensões superficiais e interfaciais. Esta propriedade faz com que os surfactantes sejam adequados para um grande número de aplicações industriais, como, por exemplo: detergentes, emulsificantes, lubrificantes, agentes espumantes e agentes solubilizantes na dispersão de fases. A utilização dos surfactantes industrialmente é muito abrangente, pois podem atuar em diversos tipos de indústrias, tais como, têxteis, cosméticas, farmacêuticas, alimentícias, de polímeros e plásticos (BUGAY, 2009).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes são denominados biossurfactantes (CAMEOTRA et al., 2010). Predominantemente a obtenção de biossurfactantes é realizada por meio de bactérias em cultivo submerso. No entanto, bactérias, bolores e leveduras podem se desenvolver a partir de substratos sólidos, desde que a umidade esteja entre 40 e 70 % (PINTO, 2008). Os biossurfactantes são subprodutos metabólicos de bactérias e fungos. A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura na fase exponencial do crescimento de microrganismos. Em certos casos o biossurfactante é produzido durante uma parte do ciclo de crescimento e então, desativado ou incorporado em outro metabólito (VILELA et al., 2014).

Um dos principais problemas na produção de biossurfactantes é o custo envolvido neste processo. Porém, isto pode ser significativamente reduzido através da utilização de fontes alternativas de nutrientes, os quais sejam facilmente disponíveis e de baixo custo. O uso de resíduos industriais como fonte de energia, para a produção de biossurfactantes, é uma alternativa atraente para, diminuir o custo de produção, tornando o processamento viável (AL-BAHRY; AL-WAHAIBI; ELSHAFIE, 2013). No entanto, a seleção de substratos residuais envolve a dificuldade de encontrar um resíduo com equilíbrio certo de nutrientes, suficiente para propiciar o crescimento do micro-organismo e produção de metabólitos. Resíduos agroindustriais com alto teor de carboidratos ou lipídios são atrativos para a utilização neste processo, pois geralmente apresentam os nutrientes necessários para serem utilizados como substrato (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A glicerina é obtida através do processamento do biodiesel e considerada excedente do processo. Pelo fato do glicerol ser altamente assimilável por bactérias e fungos, este tem sido utilizado como fonte de carbono para diferentes cultivos (SOUZA et al., 2014). O lodo proveniente dos tanques de armazenamento de petróleo é composto por hidrocarbonetos,

sedimentos, metais e água. O lodo apresenta problemas ambientais, uma vez, que facilmente contamina o ambiente (YAN; LU; YANG, 2012). No entanto, os micro-organismos produtores de biossurfactantes podem atuar em substratos constituídos por uma alta concentração de hidrocarbonetos tornando a borra de petróleo uma possível fonte de carbono (PIRÔLLO, 2006). O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo gerado durante o processamento de açúcar e etanol, cerca de 10 % deste bagaço não apresenta uso (AFONSO, 2012). O bagaço é constituído por carboidratos que podem ser utilizado como fonte de carbono para processos fermentativos (RAKESHKUMAR et al., 2013). Aguiar, Limberger e Silveira (2014) mencionam que existe uma grande geração de resíduo de pescado, sendo uma parte ainda descartada de forma incorreta. Os resíduos da indústria pesqueira são compostos com alto teor proteico e lipídico o que propicia o uso como fonte de energia para processos biotecnológicos.

Os biossurfactantes têm sido amplamente avaliados quanto a sua estabilidade e comportamento frente a condições extremas do ambiente. Uma vez, que a maioria dos processos, tanto industriais quanto ambientais, estão associados a condições adversas de temperatura, pressão, força iônica, pH, presença de solventes, entre outros. Assim, o estudo da estabilidade e do comportamento dos biossurfactantes torna-se importante para que sua utilização seja viabilizada (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Os biossurfactantes apresentam inúmeras aplicações, em uma variada gama de setores industriais. Podem ser utilizados em processos de biorremediação (água e solo), recuperação melhorada do petróleo, limpeza de reservatórios de petróleo, indústrias de alimentos (emulsificantes, dispersantes e solubilizantes), sequestrante de metais, remoção e solubilização de tintas, entre outros (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Estes são compostos promissores que visam substituir os surfactantes sintéticos no futuro, uma vez que apresentam características como, serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade e se apresentarem estáveis em condições adversas do ambiente (COSTA et al., 2006).

Diversos trabalhos sobre produção e aplicação de biossurfactantes foram desenvolvidos anteriormente a este estudo. Inicialmente a linha de pesquisa foi desenvolvida utilizando cultivo de fungos em estado sólido. Pinto (2008) produziu biossurfactante utilizando bactérias e fungos a partir de resíduos industriais por cultivo submerso e em estado sólido. Aguiar (2013) e Zilio (2013) produziram biossurfactantes a partir de resíduos industriais utilizando *Corynebacterium aquaticum* e aplicaram em processos de biorremediação. Baseado nestes estudos, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactantes a partir de resíduos industriais e aplicá-los em processos de remoção de tintas e adsorção de corantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi produzir biossurfactantes a partir de diferentes resíduos industriais, verificar a estabilidade dos mesmos e aplicá-los na remoção de tintas e adsorção de corante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biossurfactantes a partir de glicerol, bagaço de cana, lodo residual de tanques de armazenamento de petróleo e resíduo de pescado, utilizando duas bactérias (*Corynebacterium aquaticum* e *Corynebacterium spp.*);
- Determinar o caráter iônico do tensoativo produzido;
- Observar a estabilidade dos biossurfactantes em diferentes condições de pH, temperatura e concentração de NaCl;
- Aplicar os biossurfactantes na remoção de tintas e adsorção de corantes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são compostos tenso-ativos, sintetizados por micro-organismos. Estas moléculas possuem capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais de soluções. Os biossurfactantes são uma alternativa para a substituição dos surfactantes químicos, os quais são produzidos quimicamente a partir de derivados de petróleo (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

Biossurfactantes possuem várias vantagens sobre os surfactantes produzidos a partir de produtos químicos, tais como, menor toxicidade, biodegradabilidade superior, melhor compatibilidade ambiental, seletividade elevada e atividade específica em condições de temperaturas extremas, pH, salinidade, e por fim, capacidade de ser sintetizado a partir de matérias-primas renováveis (NALINI; PARTHASARATHI, 2013).

Os biossurfactantes apresentam uma estrutura comum que possui uma porção hidrofílica, podendo ser composta de aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica que pode ser composta de uma cadeia carbonada de um ou mais ácidos graxos, saturados ou insaturados (DESAI; BANAT, 1997). Essa composição da molécula confere a estes tensoativos características para serem utilizados como detergentes, agentes emulsionantes, agentes de formação de espuma, e dispersantes, além de torná-los versáteis em processos químicos (KHAN et al., 2011).

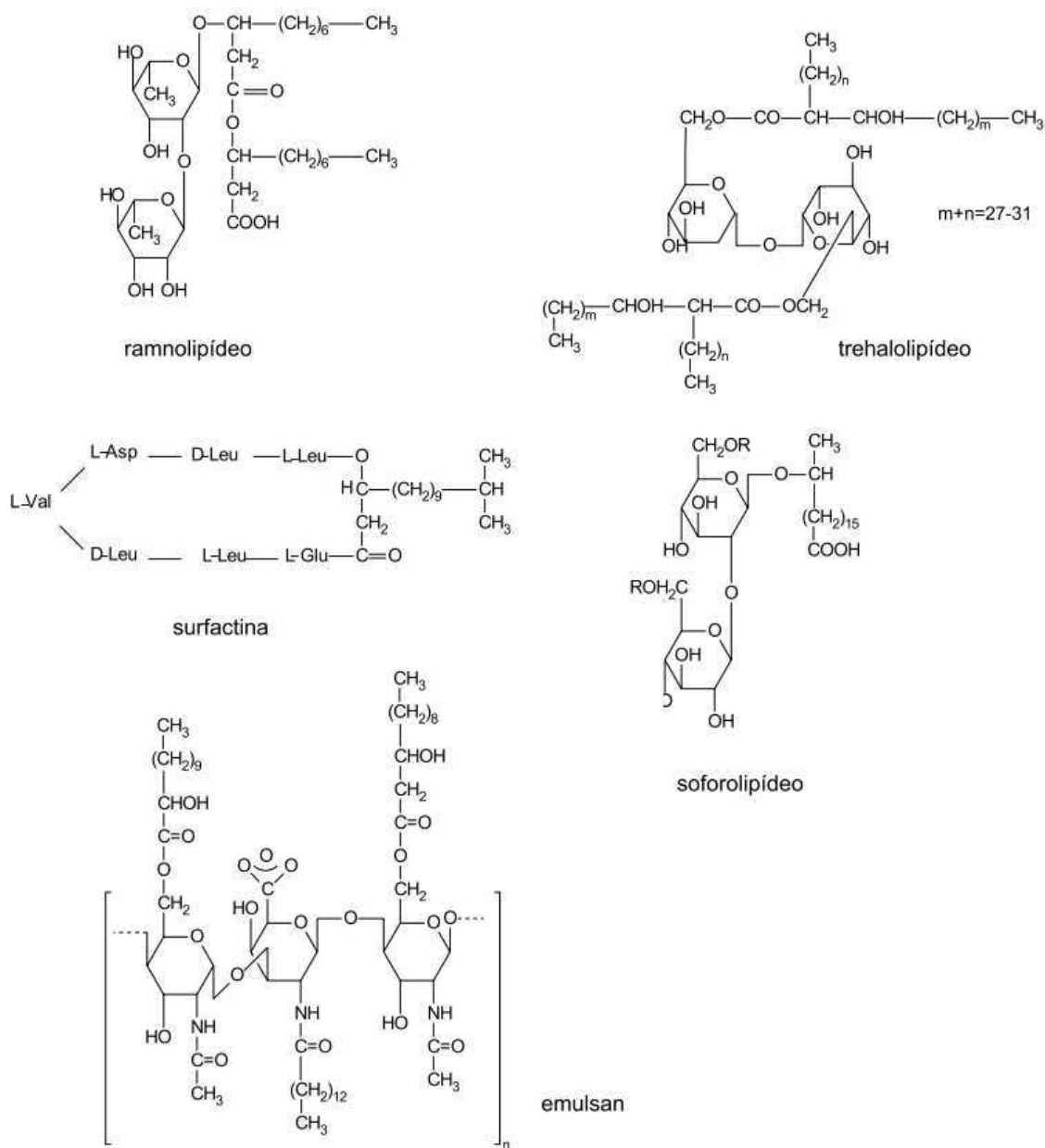
A maioria dos surfactantes microbianos são moléculas complexas, compreendendo diferentes estruturas que incluem peptídeos, glicopeptídeos, glicolipídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos, como mostra a Figura 1 (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Segundo Matsuura (2004) a atuação dos biossurfactantes está ligada ao tipo de estrutura que forma estes compostos. Biossurfactantes como os glicopeptídeos promovem uma diminuição das tensões superficiais por conta do baixo peso molecular. E biossurfactantes compostos por polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros são melhores agentes dispersantes.

Alguns Autores sugerem a separação dos biossurfactantes em grupos de acordo com seu peso molecular. Os biossurfactantes de peso molecular baixo (glicolipídeos) apresentam melhor atuação em relação a redução da tensão superficial, por outro lado, os biossurfactantes de alto peso molecular (polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e

misturas de mais de um tipo de polímero) estabilizam emulsões óleo-água e água-óleo de forma mais eficiente (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; VILELA, 2014).

Figura 1 – Estrutura química de alguns tipos de biossurfactantes



Fonte: Nitschke e Pastore (2002)

Devido as diversas estruturas e propriedades os biossurfactantes podem ser aplicados em diversos setores industriais (SOBRINHO, 2007).

3.1.1 Propriedades dos biossurfactantes

Algumas propriedades dos biossurfactantes são muito importantes na avaliação da sua atuação e na seleção de micro-organismos produtores destes agentes, dentre estas, podemos citar, capacidade emulsificante, solubilidade, capacidade de detergência, concentração micelar crítica baixa, capacidade estabilizante e capacidade de diminuição da tensão superficial (DEULEU e PAQUOT, 2004).

Embora existam diversos tipos de biossurfactantes com propriedades e composições químicas diferentes, algumas características são comuns aos biotensoativos, porém vantajosas em relação aos surfactantes convencionais (SOBRINHO, 2007).

- Atividade superficial e interfacial: Os biossurfactantes apresentam maior eficiência e são mais efetivos que os surfactantes convencionais, uma vez que apresentam menores tensões em menores concentrações.
- Biodegradabilidade: os biotensoativos podem ser degradados em água e solo facilmente, isso possibilita a utilização destes em processos naturais, como biorremediações ou até mesmo em tratamento de resíduos;
- Toxicidade reduzida: a baixa toxicidade destes compostos permite a sua utilização na indústria de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos;
- Apresentam tolerância à temperatura, pH e força iônica: uma grande variedade de biossurfactantes podem ser utilizados em condições drásticas do ambiente.

3.1.1.2 Estabilidade dos biossurfactantes

De acordo com Silva et al. (2010) os biossurfactantes são estáveis mesmo quando submetidos em condições de difícil atuação, como, ampla faixa de pH, concentrações salinas elevadas e diversas temperaturas. Em geral, os biossurfactantes mantêm suas atividades mesmo quando submetidos a temperaturas acima de 100 °C. Em relação a alteração do pH do meio, os biossurfactantes mantêm sua atuação em diversos pHs, embora possam apresentar algumas alterações de suas propriedades.

Vilela et al. (2014) avaliaram a atuação dos biossurfactantes em processos com variadas concentrações salinas, entre 15 e 20 % de NaCl, o extrato contendo biossurfactante e sal tornou-se insolúvel e isso dificultou a atuação do biotensoativo, no entanto, abaixo destas concentrações, em geral, estes compostos atuaram de forma efetiva.

Segundo Sobrinho (2007) o lipopeptídeo obtido a partir do *Bacillus licheniformis* JF-2 permaneceu estável a 75 °C por até 140 h e em pHs entre 5 e 12. Além disto, os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de sal, um percentual muito superior quando comparado com os surfactantes convencionais que com 2 % de sal já podem ser inativados.

A estabilidade dos biossurfactantes em relação a elevadas temperaturas por curtos períodos de tempo, sugere uma possível utilização em processos de esterilização, podendo estes serem aplicados em diversos processos industriais (GARBINO, 2013).

O conhecimento sobre a estabilidade dos biossurfactantes é muito importante e de grande interesse, uma vez que indica a capacidade dos biotensoativos atuarem em ambientes de condições adversas (BOGNOLO, 1999).

3.2 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Os processos fermentativos são classificados quanto ao modo de cultivo em: fermentação submersa e fermentação em estado sólido (REGULY, 2000). Estes cultivos são os processos biotecnológicos mais utilizados para a produção de metabólitos a partir de micro-organismos. A principal diferença entre as duas técnicas é o teor de água contido nos meios de cultivo. A fermentação em estado sólido utiliza substratos com baixo conteúdo de água, seus teores variam entre 30 e 70 %. Por outro lado, a fermentação submersa utiliza a água como solvente e os substratos apresentam-se dissolvidos no meio de cultivo (BUGAY, 2009).

A produção de biossurfactante através de fermentação em estado sólido requer etapas de extração e purificação para obtenção do bioproduto, o que aumenta os custos e número de etapas até que o produto esteja disponível (MARTINS et al., 2006). A nível laboratorial, a produção de biossurfactantes tem sido desenvolvida utilizando, principalmente, cultivo submerso (BUGAY, 2009).

Conforme Desai e Desai (1993), os biossurfactantes podem ser produzidos por uma enorme variedade de micro-organismos, porém destacam-se as bactérias. O tipo de composto produzido por estes micro-organismos varia de acordo com as variáveis de cultivo, como concentração e tipo de substrato, presença de íons no meio de cultura, tipo de micro-organismos, além das demais condições intrínsecas ao cultivo.

A maior parte dos biossurfactantes são secretados no meio de cultura durante o processo de crescimento microbiológico. O aumento da concentração de biossurfactante

durante o cultivo facilita a utilização de fontes de carbono insolúveis presentes no meio, uma vez que, os biossurfactantes auxiliam no transporte destes compostos insolúveis através das membranas celulares (SANTOS, 2011).

A produção de surfactantes de origem microbiana em escala comercial tem sido dificultada devido ao seu baixo rendimento e alto custo de produção, sendo necessário o desenvolvimento de estudos baseados em três fatores: custo da matéria-prima inicial; rendimento da produção pelo micro-organismo; e a disponibilidade de uma produção e recuperação do produto economicamente adequada. Dentro deste contexto, três estratégias básicas têm sido adotadas mundialmente para tornar a produção de surfactantes de origem biológica financeiramente competitiva: a utilização de substratos de baixo custo e/ou renováveis; desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultivo e o custo associado ao processo de separação para uma máxima produção e recuperação dos biossurfactantes; e o desenvolvimento de cepas modificadas geneticamente de modo que apresentem uma maior produtividade dos biossurfactantes (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

3.2.1 Cultivo submerso

O cultivo de micro-organismos pode ser descrito por um somatório de etapas, no qual o meio de cultura é preparado a fim de fornecer ao micro-organismo responsável pelo processo os componentes ou nutrientes que este necessita. O meio fermentativo utilizado para o cultivo do micro-organismo é geralmente esterilizado com a finalidade de eliminar contaminantes indesejáveis, fator que leva à redução da interferência nos resultados. Outros fatores relevantes no processo de fermentação são: o controle da temperatura, pH, agitação, concentração de nutrientes, entre outros. É necessário ressaltar que deve haver controle desses fatores já mencionados de modo que forneça condições essenciais para o micro-organismo se desenvolver e produzir os bioprodutos desejados (ALONSO, 2001).

A fermentação submersa designa-se como um processo pelo qual se utiliza um meio fermentativo líquido em que as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis (FEITOSA et al., 2010). Este tipo de cultivo possui uma maior probabilidade de contaminação, por conta do uso de maior quantidade de água, quando comparado com a fermentação em estado sólido (ALONSO, 2001). No entanto, a utilização da fermentação submersa apresenta como excelente vantagem a possibilidade da medição da tensão superficial diretamente no meio de cultivo (BUGAY, 2009).

Para o processo de fermentação submersa os reatores mais utilizados segundo a literatura são os de bancada, que consistem em frascos do tipo Erlenmeyer acoplados em agitadores orbitais (AGUIAR, 2013; AL-BAHRY; AL-WAHAIBI; ELSHAFIE, 2013; LUNA et al., 2013; MARTI; COLONNA; PATRA, 2014; PINTO, 2008; RUFINO et al., 2014; SILVA et al., 2010; VILELA et al., 2014). No entanto, também é mencionado o uso de reatores mais sofisticados com controladores automáticos de diversos parâmetros do cultivo. Em geral, estes reatores são mais usados para produções em maior escala (MARTI; COLONNA; PATRA, 2014).

Lotfabad et al. (2009) produziram biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* MR01 utilizando glicose como substrato através de fermentação submersa e obtiveram tensões de 27 mN/m. Vaz et al. (2012) obtiveram biossurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* EG1 utilizando glicerol como fonte de carbono. Os autores relataram tensões superficiais próximas de 30 mN/m. Silva et al. (2010) produziram biossurfactantes a partir de glicerol residual como substrato utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 em fermentação submersa. Os autores obtiveram tensões entorno 28 mN/m em pH 8.

3.2.2 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes ocorre principalmente a partir de micro-organismos aeróbios. As fontes de carbono utilizadas para a produção destes biocompostos podem ser diversas, tais como, hidrocarbonetos, óleo e gorduras, carboidratos, entre outros. Os biotensoativos são excretados extracelularmente ou fazem parte da membrana celular durante o crescimento do micro-organismo (BOGNOLO, 1999; SANTOS, 2011).

Existe uma grande quantidade de micro-organismos capazes de produzir os compostos com características surfactantes (Tabela 1). Dentre as bactérias produtoras destacam-se os gêneros, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* (SOUZA; VESSONI-PENNA; SANTOS, 2014). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem as leveduras *Torulopsis sp* (soforolipídeos), *Candida sp* (liposan e fofolipídeos) (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002) e os bolores *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium sp* (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

O gênero *Corynebacterium* é representado morfologicamente por bacilos ou cocobacilos gram positivos, sendo comum a presença de grânulos metacromáticos no interior das células. As espécies envolvidas no gênero são comumente aeróbias ou anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose e outros carboidratos (OLIVEIRA et al., 2005).

Alguns estudos utilizando a *Corynebacterium spp.* para a produção de biossurfactantes foram realizados. Autores como, Decesaro et al. (2013); Deon et al. (2012) e Pinto, Martins e Costa (2009); utilizaram esse micro-organismo para a produção de biossurfactantes, obtendo resultados satisfatórios para as respostas de tensão superficial e atividade emulsificante. A *Corynebacterium aquaticum* também foi estudada para a produção de biossurfactantes por autores como, Pinto; Martins e Costa (2009), Aguiar; Limberger e Silveira (2014) e Zilio et al. (2012).

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Tipo de biossurfactante	Micro-organismo produtor
Trealose lipídeos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia sp.</i>
Ramnilipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>
Soforose lipídeos	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> ,
Celobiose lipídeos	<i>Ustilago maydis</i>
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter sp.</i>
Poliol lipídeos	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>
Diglicosil diglicerídeos	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lichesina A, Lichesina B	<i>Bacillus licheniformis</i>
Lipopolissacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida lipolytica</i>
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>

Fonte: Adaptado de Mulligan (2005)

3.2.3 Resíduos industriais utilizados como substrato

Acredita-se que o substrato para a produção dos biossurfactantes corresponda a valores superiores de 30 % do custo da produção (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). Por outro lado, muitos resíduos de processos industriais tornam-se poluentes ou implicam às

indústrias altos custos para o tratamento. Desta forma, o uso de substratos de baixo custo, como resíduos industriais tornam-se de grande interesse para a produção de biossurfactantes (SOBRINHO, 2009). Subprodutos industriais com alto teor de carboidratos, proteínas ou lipídeos têm capacidade de suprir as necessidades de utilização como matéria-prima para a produção de biossurfactantes (AL-BAHRY; AL-WAHAIBI; ELSHAFIE, 2013).

3.2.3.1 Cana-de-açúcar

Atualmente segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), nos anos de 2015/2016 o Rio Grande do Sul produziu 66,9 mil toneladas de cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais resíduos industriais no Brasil, este é oriundo do processamento da cana-de-açúcar utilizada para a produção de etanol e açúcar. Parte da cana-de-açúcar produzida vira bagaço, sendo que deste total, aproximadamente 90 % é utilizado na queima de caldeiras para obtenção de energia, e os 10 % restantes são utilizados para outras aplicações (AFONSO, 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico obtido após a moagem da cana-de-açúcar em usinas de açúcar e álcool. O bagaço é constituído por cerca de 50 % de umidade, 45 % de estruturas fibrilares e 5 % de extrativos e componentes orgânicos. Por causa do seu alto teor de carboidratos (cerca de 50 % de celulose e 25 % de hemicelulose), teor de lignina baixo e sua disponibilidade como resíduo industrial, o bagaço é particularmente adequado para a utilização como fonte de carbono para processos de bioconversão (MARTIN, et al., 2002).

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido utilizado para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, incluindo a produção de biossurfactantes (RAKESHKUMAR, et al., 2013; SARUBBO; LUNA; RUFINO, 2015 e SLIVINSKI et al., 2012).

3.2.3.2 Lodo de tanques de petróleo

As indústrias petrolíferas possuem um grande problema de acúmulo de lodo. Normalmente este acúmulo ocorre devido a bombeamentos falhos, mau funcionamento de dessalinizadores, drenagem frequente de óleos de tanques e unidades, infiltrações de tanques de armazenamento, limpeza periódica, entre outros. Poucas refinarias apresentam um destino para este tipo de produto, promovendo o aumento e acúmulo do lodo sem tratamento (KURIAKOSE; MANJOORAN, 2001).

O lodo oleoso é um material com aspecto pastoso, constituído de areia contaminada com óleo, água e produtos químicos utilizados no processo de produção de petróleo. A formação deste resíduo é oriunda principalmente de limpezas da parte inferior dos tanques de armazenamento de petróleo e seus derivados (diesel, gasolina, gás liquefeito de petróleo (GLP), solventes, querosene, óleos, lubrificantes, parafinas, óleo combustível, asfalto, entre outros). A parte oleosa da borra apresenta aproximadamente 50 % de hidrocarbonetos saturados, 30 % de hidrocarbonetos aromáticos e o restante se dividem em resinas e asfaltenos (GUIMARÃES, 2007).

Resíduos e frações de óleos pesados que se depositam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos por bombeamento convencional. A remoção normalmente requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e de alto custo (BOGNOLO, 1999).

Este resíduo oleoso pode ser degradado por micro-organismos capazes de utilizar os hidrocarbonetos, presentes neste substrato, como fonte de carbono para a obtenção de energia. Em geral, os micro-organismos capazes de sintetizar biossurfactantes possuem a capacidade de desenvolvimento em condições adversas, tornando este um substrato de interesse (DECESARO et al., 2013).

Poucos são os estudos que utilizam este resíduo para produção biotecnológica. Pirôllo (2006) produziu biossurfactante utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de lodo de tanques de petróleo e obteve tensões de 37 mN/m com redução de 27 % da tensão superficial inicial.

3.2.3.3 Glicerol

A glicerina ou glicerol, nomes comuns do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, é o principal subproduto gerado durante a produção de biodiesel (SÁ, 2011). Uma alternativa para a produção de combustíveis é a produção do biodiesel. No Brasil, a alta produção de biodiesel acarretou em um excedente na produção de glicerina (resíduo da produção de biodiesel), a qual não apresenta utilização determinada (SANTOS, 2009). Segundo a ANB (Associação Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível) no ano de 2015 foram produzidos aproximadamente 24 milhões de barris de glicerol. Segundo Leitão et al. (2011) ao utilizar a rota de transesterificação para a produção de biodiesel são gerados 100 g de glicerina para cada Kg de biodiesel. Estima-se que até o ano de 2020 a produção de glicerol possa chegar a 1.630.000 ton/ano.

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos com maior valor agregado, como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização do resíduo proveniente da produção de biodiesel. Isso torna-se possível em razão do glicerol ser considerado uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias (ITO et al., 2005).

O glicerol também tem sido utilizado nos últimos anos como fonte de carbono na produção de biossurfactantes, alguns autores como, Silva et al. (2010), Bezza e Chirwa (2015) e França et al. (2015) utilizaram esse resíduo para a obtenção desse bioproduto utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992; *Paenibacillus dendritiformis* e *Bacillus subtilis* ICA56, respectivamente.

3.2.3.4 Resíduo de pescado

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) a atividade pesqueira pode ser classificada, de acordo com sua finalidade, em artesanal, industrial e amadora. Ainda segundo o MPA, o Brasil produz aproximadamente 1 milhão e 240 mil toneladas de pescado por ano, sendo que cerca de 45 % dessa produção é provinda da pesca artesanal. Contudo, há um problema referente a esta atividade que está na forma de descarte dos resíduos pesqueiros, já que estes possuem alta carga de matéria orgânica, que se mal gerenciados podem afetar as características do solo e dos recursos hídricos (BRASIL, 2014).

Durante o processamento de pescado os resíduos gerados são destinados para diferentes formas de reaproveitamento, como o processamento de farinhas, produção de silagem, utilização como adubos, processos de hidrólise e produção de óleo (AGUIAR; LIMBERGER; SILVEIRA, 2014).

Os resíduos da indústria pesqueira apresentam uma boa composição em compostos orgânicos e inorgânicos, porém, tais compostos quando disponibilizados diretamente no ambiente geram impactos ambientais negativos (SILVA; CAMARGO, 2002).

Vidotti (2011) realizou um estudo sobre o melhoramento do reaproveitamento de resíduos de pescado para a formulação de novos produtos. O autor determinou a composição proximal de resíduo industrial de pescado de água salgada e água doce conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Composição proximal de resíduo de pescado de água salgada e doce

	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas
	(%)	(%)	(%)	(%)
Resíduo de pescado de água doce	64,54	3,19	14,89	17,68
Resíduos de pescado de água salgada	71,38	5,01	1,68	23,04

Fonte: Vodotti (2011)

De acordo com Oetterer (1993), o resíduo de pescado é uma fonte rica, principalmente em lipídeos e proteínas, o que propicia o desenvolvimento de micro-organismos capazes de utilizar estes compostos para seu desenvolvimento.

Em relação a produção biotecnológica o resíduo de pescado foi utilizado por Aguiar (2013) para a produção de biossurfactantes. O Autor obteve tensões superficiais de aproximadamente 27 mN/m para concentrações de 2,5 % de resíduo de pescado como substrato utilizando *Corynebacterium aquaticum* como micro-organismo produtor de biossurfactante.

3.2.4 Avaliação da produção dos biossurfactantes

Para que ocorra a produção de biossurfactantes é necessário que haja um micro-organismo que possua a capacidade de produzir este biocomposto e também, um substrato adequado para que o micro-organismo desenvolva essa função. Para que seja possível verificar a produção de biossurfactantes se faz necessário a utilização de algumas técnicas que permitam identificar se está ou não ocorrendo a produção do bioproduto. As medidas da tensão superficial e da atividade emulsificante são as técnicas mais utilizadas para este fim (BATISTA et al., 2006; MATSUURA, 2004). É considerado um biossurfactante com boas propriedades aquele que possuir a habilidade de diminuir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m e capacidade de estabilizar emulsões em pelo menos 50 % do volume total por um período de 24 h (BATISTA et al., 2006).

Na literatura são apresentados dois métodos mais comuns para a determinação da tensão superficial, são estes:

- método da gota pendente: consiste na formação de uma gota do biossurfactante no final de um tubo capilar, então, uma câmera é utilizada para capturar a imagem formada pela gota,

estas imagens são colocadas em um *software* que calcula a tensão superficial entre as duas fases. Para este cálculo, a tensão superficial e interfacial de um líquido pode ser relacionada ao formato da gota pela Equação 1 (VILELA, 2014).

$$\gamma = \Delta\rho \cdot g \cdot R_0^2 / \beta \quad (1)$$

Onde:

γ = Tensão superficial/tensão interfacial

$\Delta\rho$ = diferença de densidade entre o fluido e a interface;

g = constante gravitacional;

R_0 = Raio da curvatura da gota no ápice de romper a estrutura

β = Constante definida através da equação de Young-Laplace (Equação 2, 3 e 4)

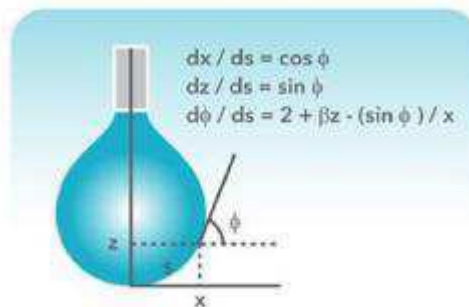
$$dx/ds = \cos \phi \quad (2)$$

$$dz/ds = \sin \phi \quad (3)$$

$$d\phi/ds = 2 + \beta z - (\sin \phi) / x \quad (4)$$

A Figura 2 mostra os ângulos utilizados para os cálculos da tensão superficial.

Figura 2 – Modelo teórico para o cálculo da tensão superficial



Fonte: Vilela (2014)

- método do anel Du Nouy: utiliza-se um equipamento denominado tensiômetro que possui um anel e uma balança precisa. Para a medição, o líquido é erguido até que o anel esteja em contato com o líquido a ser medido, a partir disto, a amostra é baixada lentamente até a formação de um filme líquido entre o anel e a amostra, esse filme é alongado até se romper e uma força máxima é medida (HUH; MASON, 1975).

Outra forma de verificar a produção e também a eficiência do biossurfactante produzido é pelo processo de emulsificação. Esta análise consiste na avaliação da capacidade do biossurfactante em estabilizar e manter a emulsão em um período de 24 h. Os biossurfactantes são colocados em presença de componentes hidrofóbicos como, óleo de soja, óleo de canola, hexano, petróleo, óleo diesel, óleo de motor, entre outros, e então, agitados e colocados em repouso para que seja observado a formação de emulsões. Este método é amplamente mencionando na literatura (AGUIAR, 2013; LUNA et al., 2013; SARUBOO; LUNA; RUFINO, 2015; SILVA et al., 2010; SIRIAM et al., 2011; VILELA et al., 2014).

Uma forma de avaliação da característica iônica dos biossurfactantes é através da determinação do caráter iônico. É um método simples que consiste no surgimento de linhas entre o biossurfactante e a solução de caráter iônico oposto. A partir disto, se determina o caráter iônico do bioproduto (MEYLHEUC; VAN OSS; BELLON-FONTAINE, 2001). Autores como Silva et al. (2010), Sobrinho (2007) e Rufino et al. (2014), determinaram as cargas iônicas dos seus bioprodutos através deste método. Segundo Sobrinho (2007) os biossurfactantes podem ser de caráter catiônico, aniônico e neutros. A carga que compõe a parte hidrofílica do biossurfactante é muito importante, pois, biossurfactantes de caráter aniônico podem ser aplicados em processos de remoção de produtos catiônicos, e vice-versa.

3.3 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

As aplicações dos biossurfactantes são diversas, estes podem ser utilizados em diferentes áreas, como mostra a Tabela 3. Dentre suas funções, os biossurfactantes destacam-se principalmente como, emulsificantes, dispersantes, fungicidas, agentes molhantes, sequestrantes de metais, agentes espessantes, agentes espumantes, redutores de viscosidade, detergentes e agentes de recuperação (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Embora autores como Nitschke; Pastore (2002) e Banat, Makkar e Cameotra (2000) mencionem o uso de biossurfactantes no processamento de tintas, mais informações não são verificadas a respeito deste uso. Segundo os autores, os biossurfactantes podem ser usados como agente emulsionantes e molhantes de tintas.

A aplicação mais atraente para os biossurfactante sem um futuro próximo, seria na área ambiental, onde estes podem ser utilizados para melhorar a dispersão em óleo, biodegradar e remover metais pesados (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004). Além disto, os biossurfactantes podem ser utilizados para limpeza de reservatórios de petróleo (VIDOTTI,

2011), recuperação melhorada do petróleo (AL-BAHRY; AL-WAHAIBI; ELSHAFIE, 2013) e processos de biorremediação (LUNA et al., 2012).

Tabela 3 – Exemplos das principais aplicações dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos;
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de Higiene;
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas;
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura;
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios;
Agentes espessantes	Tintas e alimentos;
Sequestrantes de metais	Mineração;
Formadores de vesículas	Cosméticos;
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos;
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo;
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos;
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água;
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos;
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo;

Fonte: Banat, Makkar e Cameotra (2000)

Estudos sobre a utilização de biossurfactantes na remediação de solos contaminados com metais pesados também têm sido expressivos, seja pela complexação das formas livres do metal em solução aquosa, promovendo a adsorção do metal aos biossurfactantes, ou pelo acúmulo de biossurfactantes na interface sólido/ líquido, sob condições de reduzida tensão interfacial, permitindo seu contato com o metal adsorvido (PACHECO, 2008).

Em contaminações ambientais por derramamento de óleo e produtos petrolíferos um grande impacto é causado, não apenas pela presença de componentes hidrofóbicos, mas também, contaminação por metais. A maioria das técnicas de contenção destes desastres não são suficientes para agir em ambos problemas. Os biossurfactantes são tensoativos que podem atuar de forma a remover ambos contaminantes. Além disto, são compostos de baixa

toxicidade e solúveis em água, o que facilita a remoção e posterior biodegradação dos agentes (FRANÇA et al., 2015).

3.4 ATUALIDADES NA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A maior produção de biossurfactantes vem sendo realizada a partir de resíduos da indústria. Procura-se a utilização de fontes de carbono de baixo custo e que venham a reaproveitar compostos que seriam descartados (SARUBBO; LUNA; RUFINO, 2015).

França et al. (2015) produziram biossurfactante por *Bacillus subtilis* ICA56 utilizando resíduos de queijo, suco clarificado de caju, óleo de girassol e glicerol. Os Autores obtiveram biossurfactantes que apresentaram tensões superficiais de 31, 30, 36 e 28 mN/m, respectivamente.

Sarubbo, Luna e Rufino (2015) produziu biossurfactante por *Pseudomonas sp* utilizando 3 % óleo de fritura de soja e 3 % bagaço de cana-de-açúcar, simultaneamente. Os autores produziram os biossurfactantes por cultivo submerso utilizando ambos resíduos. Obtiveram como melhor tensão superficial 27 mN/m para uma concentração de 5 mg/L de biossurfactante.

A utilização de biossurfactantes como demulsificantes foi estudada por Luna et al. (2015). Os demulsificantes são utilizados para processos de separação de produtos químicos de óleos residuais. Na indústria, para este fim, são utilizadas combinações de biotensoativos classificadas como tóxicas ao meio ambiente. O uso de biossurfactantes tem muito a agregar a este tipo de uso, uma vez, que apresentam biodegradabilidade, baixa toxicidade e ainda apresentam boa atuação em diferentes pHs, concentração de sal e temperatura. Os autores utilizaram óleo refinado de amendoim para a produção do biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995. Os autores reportam bons resultados referentes ao biotensoativo produzido por este micro-organismo em relação aos resultados de demulsificação. O biossurfactante apresentou taxa de 40,6 % de separação de óleo de motor da água salgada.

Os biossurfactantes têm sido estudados devido ao seu potencial antimicrobiano. El-Sheshtawy; Doheim (2014) estudaram a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores testaram a inibição do crescimento microbiológico utilizando o biossurfactante como antimicrobiano. Os estudos indicaram que o biossurfactante apresenta atividade antimicrobiana para bactérias gram positivas e gram negativas. Além disto, foi testada a atividade antifúngica que mostrou que o biossurfactante inibiu o crescimento de *Penicillium chrysogenum* e *Candida albicans*.

Um recente estudo publicado utiliza biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* SPB1 como aditivo ao processo de formulação de *cookies*. Os autores desenvolveram *cookies* adicionados em várias proporções de casca de gergelim com intuito de aumentar o valor de fibras destes produtos. No entanto, para promover a melhor homogeneização da massa, os autores utilizaram dois emulsificantes, o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* e glicerol comercial. Ao final do estudo os autores verificaram que os *cookies* adicionados de casca de gergelim que utilizavam determinadas concentrações do biotensioativo apresentaram textura superior ao *cookies* que utilizavam o glicerol como emulsificante (ZOUARI et al., 2015).

A maioria dos estudos recentes sobre biossurfactantes é referente à sua utilização em processos de descontaminação, principalmente, de produtos provenientes de petróleo (SARUBBO; LUNA e RUFINO, 2015; FRANÇA et al., 2015; BEZZA; CHIRWA, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) FURG. As matérias-primas utilizadas como fonte de carbono para o cultivo foram, bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de pescado, glicerol bruto e lodo de tanques de armazenamento de petróleo. O bagaço de cana foi obtido de produtores rurais de Santo Antônio da Patrulha - RS. O resíduo de pescado foi fornecido pela Empresa Pescal situada na cidade de Rio Grande - RS, o resíduo obtido compreendia o resíduo total da indústria composto por barbatanas, cabeças, ossos, peles, escamas, músculos, vísceras e pequenos peixes inteiros. O Glicerol bruto foi fornecido pela empresa BS BIOS, situada na cidade de Passo Fundo - RS. E por fim, o lodo remanescente de tanques de armazenamento de petróleo, foi cedido pela Refinaria de Petróleo Riograndense, localizada em Rio Grande - RS.

Os micro-organismos utilizados no cultivo foram a *Corynebacterium aquaticum*, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) FURG, e a *Corynebacterium spp.* CCT 1968 obtida através da Coleção de Culturas Tropical (CCT) doada pela Fundação André Tosello, situada em São Paulo, Brasil.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Caracterização da matéria-prima

Os resíduos de pescado e o bagaço de cana foram caracterizados quanto ao teor de umidade (método nº 935.29), cinzas (método nº 923.03), proteína (método de Kjeldahl, nº 960.52) e lipídeos (método nº 920.39) de acordo com o método descrito pela Association of Official Analytical Chemists International – AOAC (2000). Os carboidratos presentes nas matérias-primas foram determinados por diferença. O glicerol foi obtido com laudo da empresa contendo sua caracterização referente ao teor de umidade, percentual de pureza e cinzas. O lodo remanescente dos tanques de petróleo foi caracterizado quanto à umidade (método nº 935.29), teor de cinzas (método nº 923.03), e lipídeos (método nº 920.39) de acordo com os métodos da AOAC (2000).

4.2.2 Produção dos biossurfactantes

4.2.2.1 Propagação e manutenção dos micro-organismos

Os micro-organismos foram armazenados sob refrigeração a 4 °C e propagados em frascos Erlenmeyers, contendo Ágar Brain Heart Infusion (BHI) para o cultivo da *Corynebacterium spp.* CCT 1968 e Ágar Plate Count (PCA) para a *Corynebacterium aquaticum*. Ambos foram incubados em Estufa (Nova Ética, Brasil) a 37 °C por um período de 48 h.

4.2.2.2 Preparação da matéria-prima

Para a utilização da matéria-prima como substrato foi necessário uma preparação dos resíduos antes de serem utilizados no processo fermentativo. O resíduo de pescado obtido da indústria pesqueira teve o seu tamanho reduzido através de uma despoldadeira mecânica (HIGH TECH, HT/2500, Brasil), esta operação também homogeneizou a matéria-prima. O bagaço de cana foi obtido em formato de fibras, estas foram secas em estufa (Modelo Q-314 D 242 - Quimis) a 40 °C por um período de 24 h. Após, foram moídas (Moinho Tipo Willye TE-650 - Tecnal) para a diminuição da granulometria, sendo está padronizada em 100 mesh. O glicerol e o resíduo de petróleo foram apenas homogeneizados manualmente.

4.2.2.3 Condução do cultivo

O cultivo aeróbio foi realizado em fermentadores de bancada de 500 mL com volume útil de 400 mL, a 30 °C, agitação orbital (Incubadora Modelo TE-420 -Tecnal) de 200 rpm por 72 h. O meio utilizado foi composto por fontes de carbono variadas e meio mineral. O meio mineral foi formulado como o descrito por Yeh, Wei e Chang (2005), constituído de NH_4NO_3 (50,0 mM), Na_2HPO_4 (3,0 mM), KH_2PO_4 (3,0 mM), CaCl_2 (7,0 μM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8 mM), EDTA sódico (4,0 μM), e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0 mM). As fontes de carbono utilizadas foram variadas nas concentrações de 3, 5 e 7 %. Após a formulação do meio de cultivo este foi esterilizado (Autoclave Vertical Modelo AV 30 - Phoenix) para eliminar qualquer contaminação pré-existente.

A adição dos micro-organismos foi realizada como descrito por Makkar e Cameotra (1998), onde a superfície do Erlenmeyer com o micro-organismo foi raspada e diluída com o

auxílio do meio mineral até atingir a densidade óptica de 0,8 – 0,9, em comprimento de onda de 600 nm (Espectrofotômetro Modelo SP 22 - Biospectro). As suspensões foram adicionadas na proporção de 2 % (v/v). Os micro-organismos foram adicionados separadamente.

O meio mineral foi verificado quanto à tensão superficial através de tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha).

4.2.3 Avaliação dos biossurfactantes produzidos durante o cultivo

A produção dos biossurfactantes foi avaliada nos tempos 0, 24, 48 e 72 h de cultivo. Conforme as amostras foram retiradas do reator, estas foram centrifugadas (Centrífuga Modelo MDW – 350 – Biosysten) por 30 min a 8667 g para a retirada das células e de resíduos sólidos, e então, foram realizadas as análises descritas a seguir.

4.2.3.1 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante óleo em água ($AE_{o/w}$) foi analisada de acordo com o método descrito por Broderick e Cooney (1982). O extrato contendo os biossurfactantes foi homogeneizado com óleo de soja através do auxílio de vortex, após foi colocado em repouso por 24 h. A atividade emulsificante consiste na diferença de altura da emulsão do tubo em relação à altura de óleo remanescente.

4.2.3.2 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi avaliada no próprio meio de cultivo, sendo obtida por meio da utilização do tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha).

4.2.3.3 Determinação de pH

O pH do meio de cultivo foi verificado através de um pHmetro (Modelo Q 400AS – Quimis).

4.2.4 Determinação do caráter iônico dos biossurfactantes

O caráter iônico foi determinado de acordo com o descrito por Meylheuc, Van Oss e Bellon-Fontaine (2001), utilizando a técnica de dupla difusão em ágar. Essa técnica consiste na avaliação de dois poços de mesma distância criados em ágar de baixa dureza (1 % de ágar-ágar), sendo um destes adicionados de uma solução de carga iônica conhecida e no outro o biossurfactante. O composto de carga iônica negativa utilizada foi o dodecil sulfato de sódio 20 mM e a solução catiônica usada foi o cloreto de bário 50 mM. O surgimento de linhas entre o poço contendo biossurfactante e o composto iônico foi capaz de sugerir o caráter iônico dos biossurfactantes. O monitoramento do caráter iônico dos biossurfactantes foi realizado por 48 h.

4.2.5 Estabilidade dos biossurfactantes em diferentes condições

Para as determinações da estabilidade dos biossurfactantes em diferentes condições de pH, temperatura e concentração de sal (NaCl) foi utilizado 50 mL do extrato do cultivo, a amostra foi retirada após 48 h de fermentação e centrifugada (Centrífuga Modelo MDW – 350 – Biosysten) por 30 min a 8667 g e utilizada para as análises. Os testes de estabilidade foram realizados em triplicada e seguiram a metodologia descrita por Silva et al. (2010) com modificações, apenas os biossurfactantes produzidos pela *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado na concentração de 3 % e bagaço de cana 3 % foram utilizados, pois estes foram os que apresentaram resultados satisfatórios de tensões superficiais e atividades emulsificantes.

A estabilidade dos biossurfactantes perante a diferentes concentrações de NaCl (1, 3, 5, 7 e 10 %) foi realizado nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min. O sal foi colocado juntamente com 50 mL do meio de cultivo contendo os biossurfactantes e permaneceu sob agitação 100 rpm (Agitador Magnético Modelo 751 – Fisaton) por 1 h. Então, a cada tempo pré-determinado era retirada uma alíquota e verificada a tensão superficial que apresentava o extrato naquele instante.

A estabilidade dos biossurfactantes em relação às diferentes temperaturas foi avaliada também variando o tempo. A temperatura variou em 20, 40, 60, 80, 100 e 121 °C e o tempo em 0, 0,5, 1, 2 e 3 h. O extrato contendo os biossurfactantes foi colocado em estufa (Modelo E.L 1.1 - Odontobras) e a cada tempo era retirado e resfriado até ± 25 °C e sua tensão superficial era verificada.

A determinação da estabilidade dos biossurfactantes em diferentes pHs foi variada em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min. O extrato com os biossurfactantes

teve seu pH ajustado utilizando NaOH 1M ou HCl 1M e então, a mistura foi mantida sob agitação 100 rpm (Agitador Magnético Modelo 751 – Fisaton) durante o experimento e a cada tempo foi verificada a tensão superficial.

4.2.6 Armazenamento do meio de cultivo contendo os biossurfactantes

Os biossurfactantes que apresentaram as melhores características, que neste caso foram, os biossurfactantes produzidos pela *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado e bagaço de cana na concentração de 3 % um período de 48 h de cultivo, foram submetidos à avaliação de sua estabilidade durante o armazenamento. No estudo do armazenamento, foram realizados dois tratamentos distintos, em um deles o meio contendo os biossurfactantes foi autoclavado e no outro o meio de cultivo foi armazenado sem nenhum tratamento adicional, em ambos, os biossurfactantes foram colocados em frascos âmbar ao abrigo de luz. A temperatura de armazenamento variou de acordo com a temperatura ambiente entre 19 e 25 °C. O tempo de avaliação totalizou 6 meses, sendo que as amostras foram coletadas nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. A cada coleta as amostras foram avaliadas quanto à tensão superficial.

4.2.7 Aplicação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes foram aplicados na remoção de tintas e na adsorção de corantes. Os biossurfactantes utilizados nesta etapa foram os que se mostraram com os melhores resultados em relação à atividade emulsificante e tensão superficial. Assim, foram utilizados os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado 3 % e bagaço de cana 3 %.

4.2.7.1 Remoção de tintas

Testes preliminares

Para a remoção de tintas previamente foram testados 3 tipos de tintas diferentes, tinta acrílica para paredes, tinta de tecido e tinta esmalte sintético para superfícies metálicas. No entanto, apenas a tinta esmalte sintético pôde ser utilizada no estudo, uma vez que as demais acabavam por se solubilizarem em água.

Baseado nos testes preliminares realizados foi utilizada tinta do tipo esmalte sintético e chapas de metal (ferro) de tamanho 3 x 3 cm e de 3 mm de espessura. As placas de metal foram imersas em um recipiente contendo a tinta. Após a chapa metálica estar completamente coberta com a tinta esta foi removida do recipiente e suspensa para que o excesso fosse retirado. Logo, a chapa contendo a camada de tinta ainda fresca foi colocada em placa de petri e coberta com a respectiva solução de cada tratamento. As soluções utilizadas para cobrir as placas foram: os biossurfactantes previamente selecionados, água destilada e solvente (aguarrás solvente constituído por mistura de hidrocarbonetos, principalmente alifáticos). As placas permaneceram durante 15 dias sob agitação orbital (Incubadora Modelo TE-420 - Tecnal) com velocidade de 50 rpm a temperatura ambiente ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nos tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias foram feitas análises macroscópicas da aparência dos metais submetidos a cada tratamento.

4.2.7.2 Adsorção de corante

Para o processo de adsorção de corantes o biossurfactante foi utilizado na forma de filme. Os filmes foram elaborados segundo Gimenez et al. (2011) com adaptações. Foi utilizado ágar 1 %, glicerol 30 % (p/v) e biossurfactante produzido a partir de resíduo de pescado e bagaço de cana, separadamente. Além disto, foi formulado um filme padrão constituído das mesmas proporções de ágar e glicerol, no entanto, utilizando água como solvente. O ágar foi disperso no extrato contendo o biossurfactante e submetido à agitação magnética (Agitador Magnético Modelo 751 – Fisaton) e aumento gradativo de temperatura até o momento que ágar foi fundido. Após, foi adicionado o glicerol e a solução filmogênica permaneceu sob agitação por 20 min a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Decorrido este tempo, a solução foi resfriada abaixo de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, dispersa em placas de petri e levada para estufa (FANEM 520, Brasil) com circulação forçada de ar a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de aproximadamente 12 h.

Para o ensaio de adsorção foi utilizada uma solução de 100 mg/L de corante vermelho 40. Foi necessário a elaboração de uma curva padrão do corante. A curva foi obtida em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Modelo SP 22 – Biospectro) em comprimento de onda de 500 nm. A curva padrão foi expressa em $\mu\text{g/mL}$ de corante x absorbância (Anexo 1).

Os ensaios de adsorção foram realizados em béqueres de 500 mL contendo a solução de corante com concentração conhecida (100 mg/L). O meio foi tamponado em pHs 6, 7 e 8. Os filmes foram fracionados para que atingissem as massas de 100 e 200 mg e adicionados aos béqueres separadamente em cada um dos pHs. Após, foram submetidos a agitação

(Agitador Magnético Modelo 751 – Fisaton) de 50 rpm a 25 °C. A cada hora uma alíquota era retirada e sua absorbância verificada, totalizando 4 h de estudo. A concentração de corante adsorvido foi calculada através da curva padrão (Anexo 1).

4.3 TRATAMENTO DOS DADOS

As determinações de tensão superficial, atividade emulsificante, pH e estudo da estabilidade, foram avaliadas através de ANOVA e teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a composição proximal do resíduo de pescado (RP), bagaço de cana-de-açúcar (BC), lodo de petróleo (LP) e Glicerol (GL).

Tabela 4 – Composição proximal das matérias-primas

Amostras	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)
*RP	69,4 ± 0,44	2,1 ± 0,30	14,4 ± 0,30	13,8 ± 0,17	0,3
*BC	7,9 ± 0,61	1,6 ± 0,10	2,3 ± 0,11	8,70 ± 0,3	79,5
*LP	32,8 ± 0,77	6,8 ± 0,06	ND	52,8** ± 1,1	ND
GL	11,5	5,5	ND	ND	ND

*Os valores são médias ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata. RP: Resíduo de pescado; BC: Bagaço de cana-de-açúcar; LP: Lodo de petróleo; GL: Glicerol; ND: Valor não determinado.

** Os lipídeos, neste caso, são considerados hidrocarbonetos.

Aguiar (2013) determinou a composição proximal de resíduo de corvina obtendo 74 % de umidade, 2,4 % de cinzas, 18 % de proteínas e 4,5 % de lipídeos. Os valores descritos pelo autor são diferentes dos valores obtidos neste estudo, em geral, a literatura reporta dados de composição proximal para resíduo de um único pescado e não para o resíduo de diversos tipos de pescado. O resíduo estudado neste trabalho compreende o resíduo total da indústria, incluindo grande quantidade de escamas, barbatanas, peles, ossos e vísceras, o que promove alterações nos valores de composição proximal, principalmente de lipídeos.

Massi e Rezende (2013) avaliaram a composição do bagaço de cana-de-açúcar, e os valores encontrados pelos autores foram de 22 % de umidade, 2 % de cinzas, 7 % de lipídeo e 2 % de proteína. Dessa forma, ao comparar com este estudo foi possível observar que os valores de cinzas, lipídeos e proteínas, se aproximam dos valores encontrados. No entanto, neste trabalho o bagaço de cana foi submetido a um processo de secagem que consequentemente promove o aumento dos teores de cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos, devido a diminuição do teor de água (7,9 %). Porém, Segundo Pereira (2006) a composição da cana-de-açúcar é variável, consequentemente a composição do bagaço também varia. Fatores como o tipo de cultivar, a época do corte e a eficiência da extração do caldo, alteram a composição do bagaço.

Kuriakose e Manjooran (2001) relatam quem em geral as borras de tanques de petróleo são compostas por 25 % de água, 5 % de sedimentos inorgânicos (areia, argila e etc), 4,8 % de cinzas e o restante de hidrocarbonetos. Neste estudo, ao analisar a borra de petróleo obteve-se um valor superior para a umidade e para as cinzas. Estes parâmetros podem variar de acordo com o tipo de componente presente na borra. O alto teor lipídico compreende derivados do petróleo como os óleos.

O glicerol utilizado neste estudo apresentou umidade de 11 %, 82,6 % de glicerol, 5,5 % de cinzas e pH 5,84. Estes dados foram obtidos pelo laudo da empresa que forneceu o material. Souza (2014) utilizou resíduo de glicerol para produção biotecnológica de hidrogênio. O autor obteve o resíduo da mesma empresa deste estudo apresentando características similares, com exceção do pH que se mostrou superior, (umidade 11 %, cinzas 6,4, 80 % de glicerol e pH 7,26) ao reportado no laudo.

5.2 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

As Figuras 3 e 4 apresentam os extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* e *Corynebacterium spp.* CCT 1968, respectivamente.

Figura 3 – Extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de (a) resíduo de pescado, (b) bagaço de cana-de-açúcar, (c) lodo de petróleo e (d) glicerina bruta

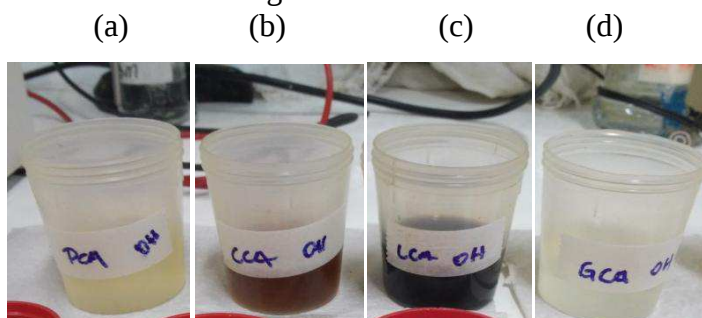
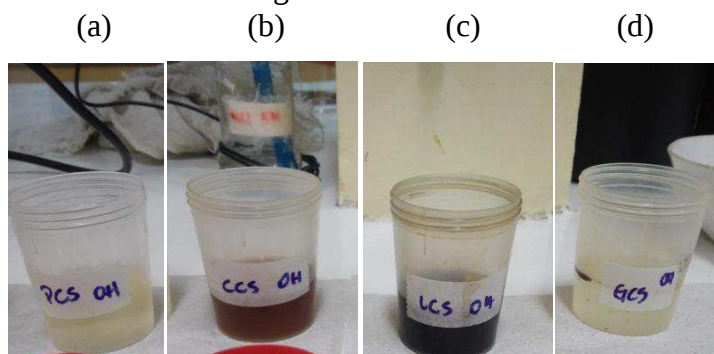


Figura 4 – Extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium spp.* CCT 1968 a partir de (a) resíduo de pescado, (b) bagaço de cana-de-açúcar, (c) lodo de petróleo e (d) glicerina bruta



Os cultivos realizados por ambas as bactérias se apresentam similares visualmente. Nota-se que as colorações dos extratos correspondem à coloração das fontes de carbono utilizadas. O bagaço de cana-de-açúcar ao ser esterilizado apresentou acentuação da cor marrom.

5.2.1 Tensão superficial

A Tabela 5 apresenta os resultados de tensão superficial obtidos nos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduos de pescado, bagaço de cana-de-açúcar, lodo de petróleo e glicerol.

A produção de biossurfactantes por *Corynebacterium aquaticum* utilizando RP como fonte de carbono promoveu uma redução de aproximadamente 25 % da tensão superficial inicial em relação a tensão superficial no tempo de 48 h de cultivo, como demonstra a Tabela 5 e a Figura 5A. A utilização das concentrações de 3 e 5 % de resíduo de pescado, para esta fonte de carbono, foram as que apresentaram as maiores diminuições da tensão superficial, de 37,4 mN/m e 36,9 mN/m para 27,8 mN/m e 28,1 mN/m em 48 h de cultivo.

Aguiar (2013) produziu biossurfactantes utilizando *Corynebacterium aquaticum*, porém utilizou soro de leite e resíduo de corvina como substrato. As concentrações utilizadas do resíduo de corvina foram inferiores a este estudo, sendo estas, 0,68, 1,29 e 2,5 %. O autor verificou que o melhor resultado, para tensão superficial, foi obtido para a maior concentração de substrato e em um tempo de 72 h de cultivo, obtendo uma tensão superficial de 28,3 mN/m.

Embora as fontes de carbono tenham sido aumentadas, neste estudo, para 3, 5 e 7 %, isto não apresenta uma co-relação entre o aumento da concentração do substrato e uma maior produção de biossurfactantes em um mesmo período de tempo.

Tabela 5 – Tensões superficiais dos extratos contendo os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum*

Resíduos	C*	Tensão superficial (mN/m)**			
		0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
Resíduo de pescado	3 %	37,4 ^{a,A} ± 0,8	31,8 ^{c,A} ± 0,8	27,8 ^{d,B} ± 0,4	34,6 ^{b,A} ± 0,6
	5 %	36,9 ^{a,A} ± 0,3	31,9 ^{b,A} ± 0,8	28,1 ^{c,B} ± 0,3	30,4 ^{b,B} ± 0,8
	7 %	36,5 ^{a,A} ± 0,1	33,2 ^{b,A} ± 0,1	29,5 ^{c,A} ± 0,2	29,2 ^{c,B} ± 0,1
	-	-	-	-	-
Bagaço de cana	3 %	42,8 ^{a,B} ± 0,7	35,3 ^{c,A} ± 0,1	33,9 ^{d,B} ± 0,8	37,8 ^{b,A} ± 0,6
	5 %	41,3 ^{a,B} ± 0,9	35,9 ^{b,c,A} ± 0,6	35,2 ^{c,A,B} ± 0,8	37,3 ^{b,A} ± 0,1
	7 %	44,9 ^{s,A} ± 0,5	36,0 ^{c,A} ± 1,2	35,4 ^{c,A} ± 0,3	37,4 ^{b,A} ± 0,0
	-	-	-	-	-
Lodo de petróleo	3 %	35,4 ^{b,A} ± 0,3	33,4 ^{c,B} ± 0,2	33,3 ^{c,B} ± 0,1	36,5 ^{a,C} ± 0,4
	5 %	34,6 ^{b,A} ± 0,4	34,4 ^{b,c,A} ± 0,2	34,0 ^{c,A} ± 0,0	38,2 ^{a,B} ± 0,1
	7 %	33,6 ^{b,c,A} ± 0,0	34,1 ^{b,A,B} ± 0,5	33,3 ^{c,B} ± 0,2	37,2 ^{a,A} ± 0,2
	-	-	-	-	-
Glicerol	3 %	28,4 ^{c,A} ± 0,2	29,3 ^{b,A} ± 0,2	27,8 ^{c,A} ± 0,4	31,6 ^{a,A} ± 0,5
	5 %	28,5 ^{b,A} ± 0,2	27,8 ^{b,B} ± 0,3	27,8 ^{b,A} ± 0,4	30,2 ^{a,B} ± 0,4
	7 %	27,8 ^{b,B} ± 0,1	27,6 ^{b,B} ± 0,0	28,3 ^{b,A} ± 0,2	29,7 ^{a,B} ± 0,4

*C: concentração de resíduo usada como fonte de carbono.

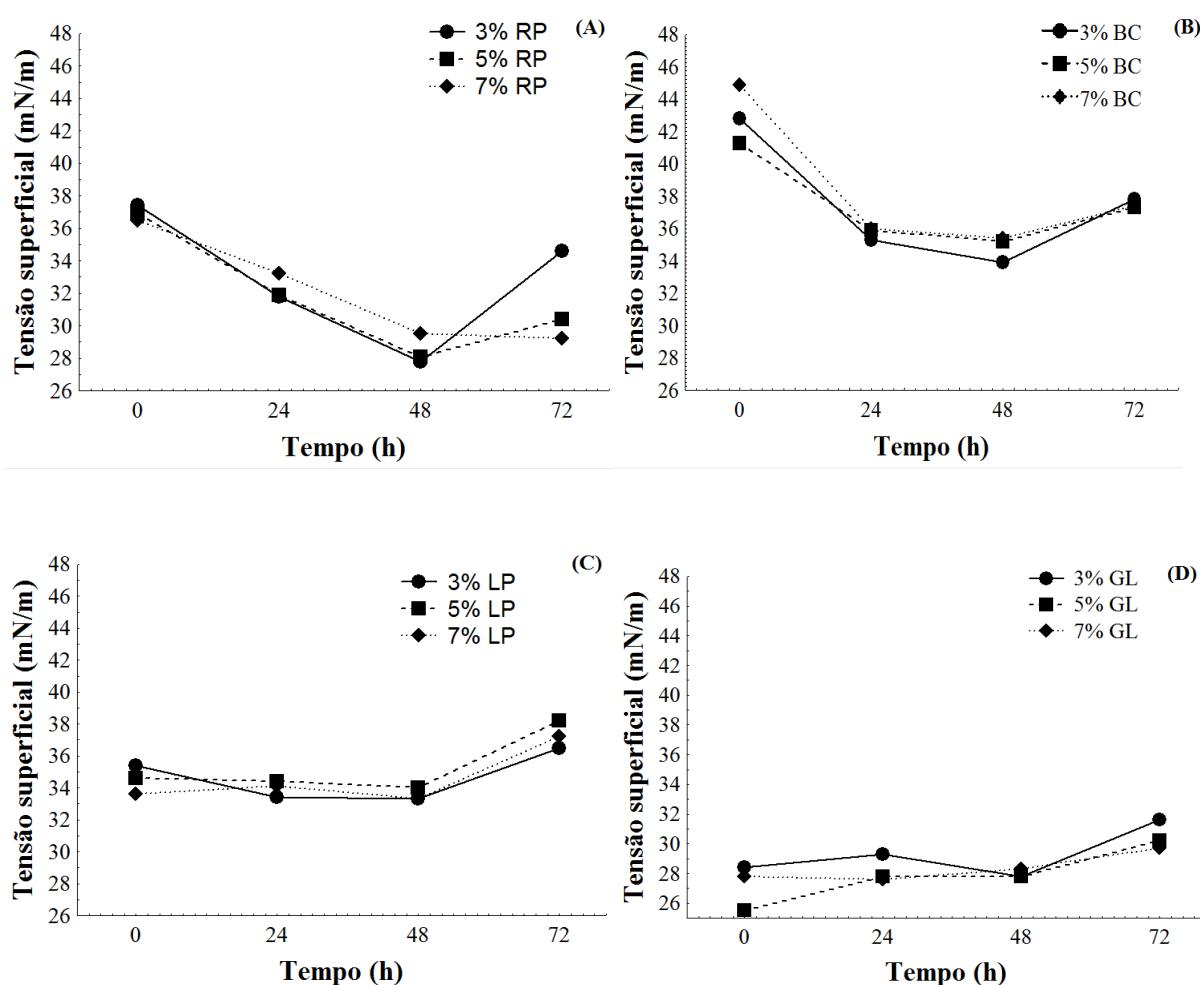
**Valores de médias ± desvio padrão. Em uma mesma linha, médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes, em uma mesma coluna para o mesmo resíduo, apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

A Figura 5 ilustra os dados de tensão superficial obtidas nos extratos dos biossurfactantes produzidos durante o cultivo de *Corynebacterium aquaticum* utilizando diferentes substratos.

Na produção de biossurfactantes por *Corynebacterium aquaticum* utilizando o experimento contendo 3 % de BC (Tabela 5 e Figura 5B) verifica-se que a tensão superficial foi reduzida em aproximadamente 21 % da tensão inicial em relação a tensão superficial no tempo de 48 h de cultivo. Rakeshkumar et al. (2013) utilizaram o micro-organismo *Klebsiella*

sp. strain RJ-03 e diversos substratos, dentre estes bagaço de cana-de-açúcar, para a produção de biossurfactantes. Os autores obtiveram tensão superficial de 47,1 mN/m em um tempo de 72 h de cultivo. O valor de tensão encontrado pelos autores foi superior ao encontrado neste estudo, sendo que valores de tensão superficial menores representam biossurfactantes com melhores características de tenso-ativos.

Figura 5 – Comportamento das tensões superficiais obtidas nos cultivos utilizando a *Corynebacterium aquaticum* (A) resíduo de pescado, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) lodo de petróleo e (D) glicerol



Em relação ao uso do lodo de petróleo, foi possível verificar que houve uma pequena redução de 6 % da tensão superficial inicial para a final em um tempo de 48 h (Tabela 5 e Figura 5C). Esse comportamento demonstra que o micro-organismo provavelmente não conseguiu assimilar os compostos que estão no lodo para a produção do bioproduto. No tempo de 72 h as tensões superficiais excederam o valor da tensão superficial inicial.

Pirôllo (2006) utilizou resíduo de petróleo para a produção de biossurfactantes através de *Pseudomonas aeruginosa* LBI nas proporções de 2, 5 e 10 %. O autor obteve como resultado uma redução da tensão superficial inicial máxima de 37 % em relação à tensão superficial obtida em um tempo de 168 h de cultivo e 10 % de concentração da borra oleosa. O autor menciona que a maior produção de biossurfactante foi quando ele utilizou a maior concentração de petróleo, a qual gerou estresse ao micro-organismo desviando a rota metabólica para a produção do biotensoativo. O autor associa que a produção de biossurfactante utilizando este tipo de substrato, em geral, é atribuída à micro-organismos isolados de locais contaminados com hidrocarbonetos.

Neste estudo, o micro-organismo utilizado foi isolado da lavagem de caminhões que transportavam produtos contendo hidrocarbonetos, por isso acreditava-se que a produção de biossurfactante com lodo de petróleo seria possível.

Outro resíduo utilizado neste estudo foi à glicerina bruta obtida como resíduo do processamento de biodiesel. Ao observar a Tabela 5 e Figura 5D foi possível verificar que a tensão superficial inicial obtida era consideravelmente baixa em torno de 28 mN/m. Ao longo do cultivo a tensão variou para aproximadamente 27 mN/m no tempo de 48 h. Além disto, para todos os tratamentos utilizando glicerol no tempo de 72 h houve um aumento das tensões superficiais em torno de 30 mN/m. Esses dados demonstram que esse substrato possivelmente não obteve êxito como fonte de carbono para produção dos biossurfactantes por este micro-organismo, uma vez que cultivo já começou com uma tensão muito baixa.

Acredita-se que a tensão inicial muito baixa atribuída ao cultivo com glicerol se dê pelas características da estrutura do glicerol, pois este é considerado um surfactante. O aumento da tensão superficial verificado ao final do cultivo pode ser atribuído ao consumo de glicerol pelo micro-organismo e consecutiva diminuição de surfactante (glicerol).

Silva et al. (2010) utilizaram glicerol residual para a produção de biossurfactante através de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. O autor obteve, em testes preliminares, que a concentração de 3 % de glicerol fornecia um valor de 28 mN/m de tensão superficial em um tempo de 120 h de cultivo. Os autores iniciaram o estudo com tensão superficial de aproximadamente 55 mN/m obtendo redução de quase 50 % do valor inicial de tensão em relação ao valor final da tensão.

Neste estudo, embora não tenha sido realizada a determinação de biomassa, através de análise visual, foi possível notar a turvação do meio de cultivo contendo glicerol em todas as concentrações. Assim, pressupõe-se que o micro-organismo foi capaz de utilizar o glicerol para o seu crescimento.

A Tabela 6 apresenta os resultados de tensão superficial obtidos nos extratos contendo os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium spp.* CCT 1968 a partir de resíduos de pescado, bagaço de cana-de-açúcar, lodo de petróleo e glicerina bruta.

Tabela 6 – Tensões superficiais dos extratos contendo os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium spp.* CCT 1968

Resíduos	C*	Tensão superficial (mN/m)**			
		0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
Resíduo de pescado	3 %	35,1 ^{a,A} ± 0,1	28,9 ^{b,A} ± 0,1	28,5 ^{b,B} ± 0,1	29,0 ^{b,B} ± 0,5
	5 %	34,8 ^{a,B} ± 0,0	32,8 ^{b,B} ± 0,5	30,2 ^{c,A,B} ± 1,7	31,9 ^{b,c,A} ± 0,9
	7 %	35,0 ^{a,A,B} ± 0,2	34,4 ^{a,C} ± 0,1	31,8 ^{b,A} ± 0,3	32,7 ^{b,A} ± 0,6
	-	-	-	-	-
Bagaço de cana	3 %	40,4 ^{a,A} ± 1,9	36,0 ^{b,C} ± 1,4	43,0 ^{a,A,B} ± 1,4	41,9 ^{a,B} ± 0,5
	5 %	42,1 ^{a,A} ± 2,1	39,9 ^{a,B} ± 0,5	39,5 ^{a,B} ± 1,2	42,9 ^{a,B} ± 0,9
	7 %	43,0 ^{a,A} ± 1,1	42,9 ^{a,A} ± 1,1	43,4 ^{a,A} ± 1,5	45,9 ^{a,A} ± 1,2
	-	-	-	-	-
Lodo de petróleo	3 %	38,1 ^{a,A} ± 0,1	37,8 ^{a,A} ± 0,9	38,4 ^{a,A} ± 0,2	37,6 ^{a,A} ± 0,4
	5 %	37,2 ^{b,B} ± 0,5	37,6 ^{a,b,A} ± 0,1	37,1 ^{b,B} ± 0,4	38,1 ^{a,A} ± 0,2
	7 %	38,4 ^{a,A} ± 0,2	37,7 ^{b,A} ± 0,2	37,6 ^{b,B} ± 0,2	38,2 ^{a,b,A} ± 0,3
	-	-	-	-	-
Glicerol	3 %	30,0 ^{a,A} ± 0,5	28,7 ^{b,B} ± 0,1	29,3 ^{a,b,A} ± 0,5	29,6 ^{a,A} ± 0,1
	5 %	29,7 ^{a,A} ± 0,7	29,4 ^{a,A} ± 0,4	29,8 ^{a,A} ± 0,0	29,6 ^{a,A} ± 0,1
	7 %	29,3 ^{a,A} ± 0,1	29,5 ^{a,A} ± 0,2	29,6 ^{a,A} ± 0,2	29,6 ^{a,A} ± 0,2

*C: concentração de resíduo usada como fonte de carbono.

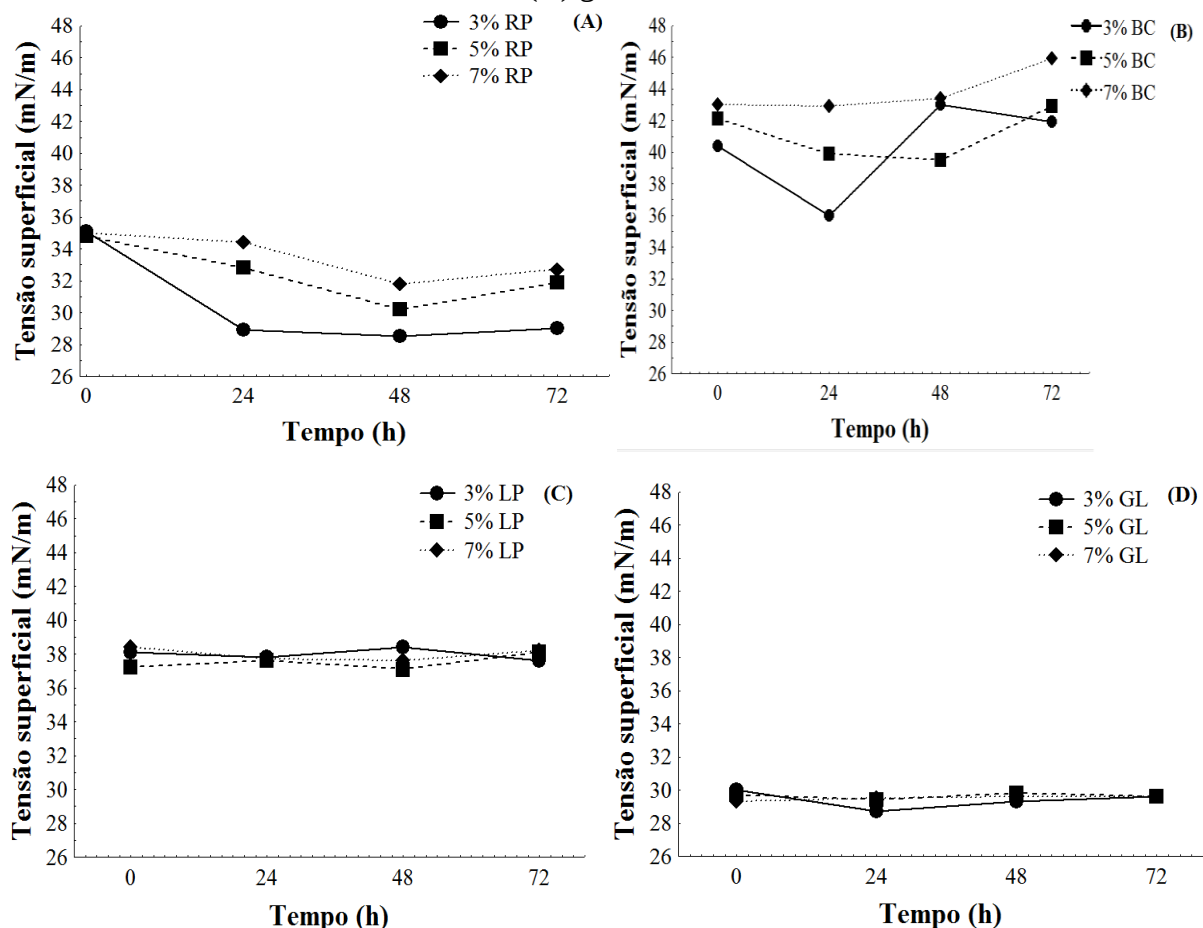
**Valores de médias ± desvio padrão. Em uma mesma linha, médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes, em uma mesma coluna para o mesmo resíduo, apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

A Figura 6 ilustra os dados de tensão superficial obtidos nos extratos dos biossurfactantes produzidos durante o cultivo da *Corynebacterium spp.* CCT1968 utilizando diferentes substratos.

O resíduo de pescado utilizado como fonte de carbono para a obtenção de biossurfactante por *Corynebacterium spp.* CCT 1968 apresentou uma diminuição máxima da tensão superficial no tempo de 48 h de cultivo. O uso de 3 % do resíduo propiciou a obtenção do extrato com a menor tensão superficial para este cultivo que foi de 28,5 mN/m. As demais

concentrações também apresentaram diminuição da tensão, no entanto, quando comparada com a tensão superficial inicial é considerada baixa.

Figura 6 – Tensões superficiais obtidas durante os cultivos utilizando a *Corynebacterium spp.* CCT1968 (A) resíduo de pescado, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) lodo de petróleo e (D) glicerol.



O uso de resíduo de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono pelo micro-organismo *Corynebacterium spp.* CCT 1968 apresentou pequena diminuição da tensão superficial inicial. O uso de bagaço de cana-de-açúcar foi mencionando na literatura por diversos trabalhos (RAKESHKUMAR et al., 2013; SLIVINSKI et al., 2012; SARUBBO; LUNA; RUFINO, 2015), no entanto, com gêneros diferentes dos micro-organismos utilizados neste estudo.

Os dados apresentados na Tabela 6 e Figura 6C mostram que a tensão superficial obtida no cultivo utilizando lodo de petróleo apresentou variação durante o cultivo, portanto, não é possível avaliar a presença ou não de biossurfactantes através da tensão superficial. No entanto, o uso de substratos hidrofóbicos com hidrocarbonetos é mencionado em estudos como o de Pirôllo (2006) e Kuriakose e Manjooran (2001).

O mesmo comportamento mencionado acima foi encontrado para o cultivo realizado com glicerol. Através da tensão superficial não foi possível verificar a produção de biossurfactantes, uma vez, que este mostrou baixa variação da tensão superficial.

Segundo Batista et al. (2006) existem diversos critérios para a seleção de biossurfactantes, dentre estes, que o bioproduto apresente uma tensão superficial abaixo de 40 mN/m.

A produção de biossurfactantes está diretamente ligada ao tipo de micro-organismo produtor, substrato utilizado e condições do processo. O micro-organismo *Corynebacterium spp*, *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* foram utilizados por Pinto et al. (2009) em cultivo submerso utilizando glicose como substrato. A menor tensão superficial obtida pelo autor foi de 54,8 mN/m utilizando ambos os micro-organismos no mesmo cultivo.

5.2.2 Atividade emulsificante

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos para a atividade emulsificante dos extratos contendo os biossurfactantes provenientes de diferentes fontes de carbonos para a bactéria *Corynebacterium aquaticum*.

A utilização do resíduo de pescado e bagaço de cana, como fonte de carbono, produziu extratos contendo biossurfactantes com atividades emulsificantes acima de 90 % (Tabela 7).

Aguiar (2013) utilizou resíduo de corvina para a obtenção de biossurfactante a partir de *Corynebacterium aquaticum*. O autor obteve como maior resultado de atividade emulsificante 55,8 % utilizando 0,68 % (m/v) da fonte de carbono. Portanto, ao relacionar este estudo com o do autor citado, verifica-se que os dados obtidos são superiores aos encontrados pelo autor. Embora o resíduo utilizado não tenha sido o mesmo, as condições de operação são muito semelhantes. Acredita-se que os dados de atividade emulsificante foram superiores devido ao aumento da concentração da fonte de carbono e as características do resíduo utilizado.

Ao avaliar a Tabela 7 pode-se notar que no tempo 0 a atividade emulsificante dos cultivos contendo resíduo de pescado são muito altas. Segundo Tomé (2011) as proteínas apresentam propriedades funcionais, sendo estas, solubilidade, capacidade de retenção de água, viscosidade, capacidade de gelificação, propriedades emulsionantes, capacidade de formação de espuma, retenção de aromas, absorção de gordura, coesão-adesão e a elasticidade. Como o resíduo de pescado apresenta uma alta quantidade de proteínas, acredita-se que esta atividade emulsificante alta no início do cultivo seja atribuída as propriedades

emulsificantes das proteínas presentes no resíduo de pescado e que estão dispersas no meio de cultivo.

Tabela 7 – Atividades emulsificantes obtidas durante os cultivos com a *Corynebacterium aquaticum*.

Resíduos	C*	Atividade emulsificante (%)**			
		0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
Resíduo de pescado	3 %	90,9 ^{a,A} ± 2,0	89,9 ^{a,A} ± 0,7	87,6 ^{a,A} ± 2,7	64,6 ^{b,C} ± 2,9
	5 %	82,7 ^{c,B} ± 0,9	82,5 ^{c,B} ± 0,3	91,6 ^{a,A} ± 0,4	86,5 ^{b,A} ± 0,8
	7 %	90,6 ^{a,A} ± 2,1	90,2 ^{a,A} ± 3,3	68,5 ^{c,B} ± 1,8	73,7 ^{b,B} ± 1,4
	-	-	-	-	-
Bagaço de cana	3 %	0	76,4 ^{a,B} ± 1,4	61,6 ^{b,C} ± 2,5	64,5 ^{b,C} ± 2,4
	5 %	0	79,4 ^{a,A,B} ± 3,3	71,3 ^{b,B} ± 1,3	71,2 ^{b,B} ± 0,9
	7 %	0	82,5 ^{b,A} ± 0,3	80,2 ^{b,A} ± 2,6	91,9 ^{a,A} ± 4,3
	-	-	-	-	-
Lodo de petróleo	3 %	0	0	0	0
	5 %	0	0	0	0
	7 %	0	0	0	0
	-	-	-	-	-
Glicerol	3 %	76,3 ^{a,B} ± 3,7	81,6 ^{a,A} ± 3,0	66,6 ^{b,A} ± 2,8	0
	5 %	79,5 ^{a,A} ± 2,5	58,4 ^{b,B} ± 0,7	44,8 ^{c,B} ± 3,7	0
	7 %	72,6 ^{b,B} ± 2,9	80,0 ^{a,A} ± 3,2	0	0

*C: concentração de resíduo usada como fonte de carbono.

**Valores de médias ± desvio padrão. Em uma mesma linha, médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes, em uma mesma coluna para o mesmo resíduo, apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

A utilização de BC como fonte de carbono para o desenvolvimento de biossurfactante apresentou como maior valor de atividade emulsificante 91,9 %, para o ensaio composto por 7 % de BC em um tempo de 72 h, como mostra a Tabela 7. Os dados obtidos na Tabela 7 para a BC como fonte de carbono indicam a produção de biossurfactantes, uma vez que no tempo 0 h não houve registro de atividade emulsificante. Sendo assim, acredita-se que a partir do tempo 0 h houve a produção do bioproduto, uma vez, que nos tempos de 24, 48 e 72 h obteve-se atividade emulsificante.

Slivinski et al. (2012) desenvolveram biossurfactantes por meio de *Bacillus pumilus* UFPEDA448 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato na concentração de 5 g/L. No entanto, os autores também utilizaram glicerol para suplementar o meio de cultivo. Assim, obtiveram 52,5 % de atividade emulsificante em um tempo de 72 h de cultivo. Os valores obtidos neste estudo apresentam-se acima do descrito pelos autores. Embora as condições não sejam as mesmas e os micro-organismos distintos, os resultados de atividade emulsificante obtidos neste estudo indicam uma alta atividade emulsificante e uma grande capacidade da *Corynebacterium aquaticum* em aproveitar os nutrientes contidos na BC.

A Tabela 7 mostra que não foram identificadas atividades emulsificantes para os cultivos contendo lodo de petróleo como fonte de carbono. Piróllo (2006) utilizou borra de petróleo para a produção de biossurfactantes por meio de *Pseudomonas aeruginosa* LBI e reportou valores de 68,7 % de emulsificação utilizando 10 % de borra oleosa como fonte de carbono. Considerando a grande diversidade de micro-organismos produtores de biossurfactantes e capazes de utilizar diferentes tipos de substratos, acredita-se que os biossurfactantes apresentem classes com propriedades e funções biológicas diferentes. Os substratos necessitam de diferentes formas de transporte e atuação de enzimas. A natureza insolúvel de substratos como os n-alcanos e outros hidrocarbonetos em meio aquoso, necessita de diferentes tipos de mecanismos que propiciem o seu consumo.

A utilização do glicerol como fonte de carbono propiciou uma atividade emulsificante de 81,6 % (Tabela 7). No entanto, apresentou um comportamento incomum. No tempo 0 h a atividade emulsificante já poderia ser considerada alta, em 24 h de processo manteve-se alta e a partir das 48 h de cultivo começou a diminuir até que fosse nula. Devido a este comportamento, acredita-se que o que propiciou a atividade emulsificante foram componentes presentes na glicerina bruta ao invés dos biossurfactantes. Além disto, pelo fato do glicerol ser considerado um surfactante a alta atividade emulsificante inicial explica sua ação tensoativa.

A glicerina tem sua aparência e características diretamente afetadas pelos componentes presentes na mistura. Em geral, a porcentagem de glicerina varia entre 40 e 70 % (p/p). Assim, suas características são afetadas devido a componentes como frações de sabões e os tipos de ácidos graxos e sais precipitados durante o processo de tratamento (THOMPSON; HE, 2006). As características descritas acima podem interferir no processo de produção dos biossurfactantes, uma vez, alteram a disponibilidade do carbono assimilável.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para a atividade emulsificante dos extratos contendo os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium spp.* CCT 1968 a partir de diferentes fontes de carbonos.

Os dados de atividade emulsificante apresentados na Tabela 8 demonstram que não foi possível observar atividade emulsificante quando se utilizou o lodo de petróleo e o resíduo de pescado como fonte de carbono.

Tabela 8 – Atividades emulsificantes obtidas durante o cultivo utilizando a *Corynebacterium spp.* CCT 1968

Resíduo	C*	Atividade emulsificante (%)**			
		0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
Resíduo de pescado	3 %	69,2 ^A ± 2,3	0	0	0
	5 %	69,5 ^A ± 1,8	0	0	0
	7 %	70,4 ^{a,A} ± 1,6	23,7 ^b ± 2,1	0	0
	-	-	-	-	-
Bagaço de cana	3 %	0	25,8 ^{b,C} ± 1,2	24,6 ^{b,B} ± 2,9	60,0 ^{a,B} ± 1,4
	5 %	0	30,2 ^{c,B} ± 1,5	88,3 ^{bA} ± 0,5	96,5 ^{a,A} ± 0,5
	7 %	0	34,1 ^{c,A} ± 1,4	86,3 ^{b,A} ± 0,1	97,6 ^{a,A} ± 0,8
	-	-	-	-	-
Lodo de petróleo	3 %	0	0	0	0
	5 %	0	0	0	0
	7 %	0	0	0	0
	-	-	-	-	-
Glicerol	3 %	0	0	0	0
	5 %	16,7 ^{a,A} ± 2,0	18,8 ^{a,A} ± 3,0	20,2 ^a ± 1,9	0
	7 %	41,2 ^{a,B} ± 0,0	30,3 ^{b,B} ± 1,5	0	0

*C: concentração de resíduo usada como fonte de carbono.

**Valores de médias ± desvio padrão. Em uma mesma linha, médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes, em uma mesma coluna para o mesmo resíduo, apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

A atividade emulsificante alta no tempo zero obtida para o cultivo contendo resíduo de pescado como fonte de carbono pode ser atribuída aos componentes presentes na fonte de carbono, como as proteínas. O decaimento sofrido pela atividade emulsificante ao longo do processo sugere que as proteínas que promoveram a atividade emulsificante inicial sofreram algum tipo de atuação dos micro-organismos fazendo com que estas perdessem suas propriedades emulsificantes.

O cultivo realizado utilizando BC como fonte de carbono obteve atividade emulsificante de 96,5 % em 72 h de cultivo (Tabela 8). Como mencionado anteriormente, Slivinski et al. (2012) obteve 52,4 % de atividade emulsificante em um tempo de 72 h de cultivo. Correlacionando os valores deste estudo com os encontrados pelo autor, verifica-se que os biossurfactantes produzidos neste estudo apresentaram propriedades emulsificantes superiores.

A utilização de glicerol como fonte de carbono para o cultivo contendo *Corynebacterium spp.* CCT 1968 apresentou alta atividade emulsificante no tempo zero que foi decaindo ao longo do cultivo. A atividade emulsificante inicial alta é atribuída a componentes, em geral, presentes na glicerina bruta como, por exemplo, sabões provenientes do processo de obtenção do biodiesel. Além disto, o glicerol também pode ser considerado surfactante.

De acordo com Batista et al. (2006) um biossurfactante é considerado eficiente quando possui a habilidade de baixar a tensão superficial para valores inferiores de 40 mN/m, além de possuir a capacidade de estabilizar emulsões em, no mínimo, 50 % do volume total por 24 h.

Embora os cultivos fossem compostos por meio mineral, este se mostrou inerte em relação ao parâmetro de tensão superficial, uma vez que ao medir a tensão superficial do meio mineral o valor obtido foi de 69 mN/m, assemelhando-se a tensão superficial da água que fica entorno de 72 mN/m. Dessa forma, as variações das tensões superficiais nos tempos zero, em todos os cultivos, podem ser unicamente atribuídas as fontes de carbono que constituíam o meio.

De um modo geral, a produção de biossurfactante por *Corynebacterium aquaticum* utilizando resíduo de pescado como fonte de carbono se mostrou satisfatória. Foram obtidas tensões superficiais a abaixo de 30 mN/m. Para a produção de biossurfactante utilizando o mesmo micro-organismo e substituindo a fonte de carbono por bagaço de cana, a tensão superficial apresentou como menor valor tensões próximas a 33 mN/m e como maior atividade emulsificante valores superiores a 90 %.

A produção de biossurfactante utilizando *Corynebacterium aquaticum* a partir de lodo de petróleo não foi verificada através da medição da tensão superficial e nem por meio da determinação da atividade emulsificante. O mesmo foi verificado para a produção de biossurfactante pelo mesmo micro-organismo utilizando glicerol como fonte de carbono. Embora alguns biossurfactantes apresentem melhores resultados na avaliação de tensão superficial e/ou atividade emulsificante, a não verificação do biocomposto por ambos métodos dificulta a constatação da produção do biotensoativo.

O uso do micro-organismo *Corynebacterium spp.* CCT 1968 para os cultivos contendo resíduo de pescado apresentou redução da tensão superficial para valores abaixo de 29 mN/m, ao passo, que para a determinação da atividade emulsificante no tempo de 48 h de cultivo este apresentou valores de 0 %. Isto mostra que o biossurfactante produzido por este micro-organismo utilizando este resíduo como fonte de energia possui baixa ou nenhuma capacidade emulsificante, porém mantém tensões superficiais dentro do descrito na literatura como um biossurfactante eficaz.

A produção de biossurfactante utilizando lodo de petróleo e glicerol através da *Corynebacterium spp.* CCT 1968 não se mostrou eficiente. Uma vez que as tensões superficiais não foram reduzidas e atividades emulsificantes não foram verificadas. No entanto, para o biossurfactante produzido pelo mesmo micro-organismo utilizando bagaço de cana como fonte de carbono, as tensões superficiais demonstram comportamento variado ao longo do cultivo, com uma queda no tempo de 24 h de seguida por um aumento de tensão no decorrer do cultivo. Porém, a atividade emulsificante aumentou em valores acima de 90 % conforme os dias de cultivo. Acredita-se que o biossurfactante produzido pela *Corynebacterium spp.* CCT 1968 a partir de bagaço de cana seja um agente emulsionante mais efetivo do que um agente com capacidade de redução da tensão superficial.

Os extratos contendo os biossurfactantes apresentaram valores de tensões superficiais e atividades emulsificantes que não seguiram uma correlação direta. Uma atividade não está necessariamente atrelada a outra, essas características estão diretamente relacionadas ao tipo de biossurfactante produzido. Segundo Christofi e Ivshina (2002) os biossurfactantes apresentam diferentes características de acordo com seu peso molecular. Biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam melhor atuação na redução de tensões superficiais, enquanto, biossurfactantes de alto peso molecular promovem o aumento de atividade emulsificante.

5.2.3 Determinação do pH

As Figuras 7 e 8 apresentam o comportamento dos pHs dos meios de cultivos utilizando os diferentes resíduos em um período de 72 h.

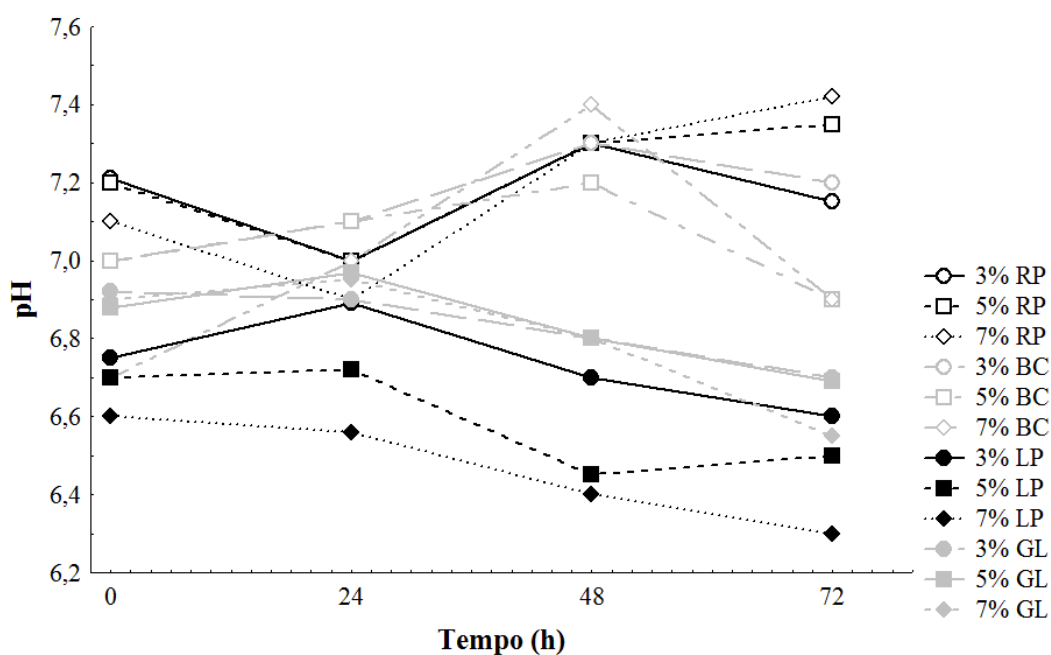
Neste estudo não foram realizados ajustes de pH durante o cultivo. O pH foi apenas monitorado para que fosse possível visualizar alterações sofridas durante o processo.

O pH para os cultivos realizados com os dois micro-organismos manteve-se entre 6,3 e 7,4, para todos os substratos utilizados. O cultivo realizado com resíduo de pescado por

ambos os micro-organismos, em geral, manteve-se próximo de 7 com um leve decréscimo no tempo de 24 h. Lima (1996) menciona que a produção de biossurfactante está compreendida entre o final da fase exponencial e durante o início da fase estacionária de crescimento microbiológico. Durante a fase exponencial ocorre um decaimento do pH do meio, e conforme ocorre a diminuição do crescimento, ocasiona a redução de atividades metabólicas e a morte celular propiciando o aumento do pH.

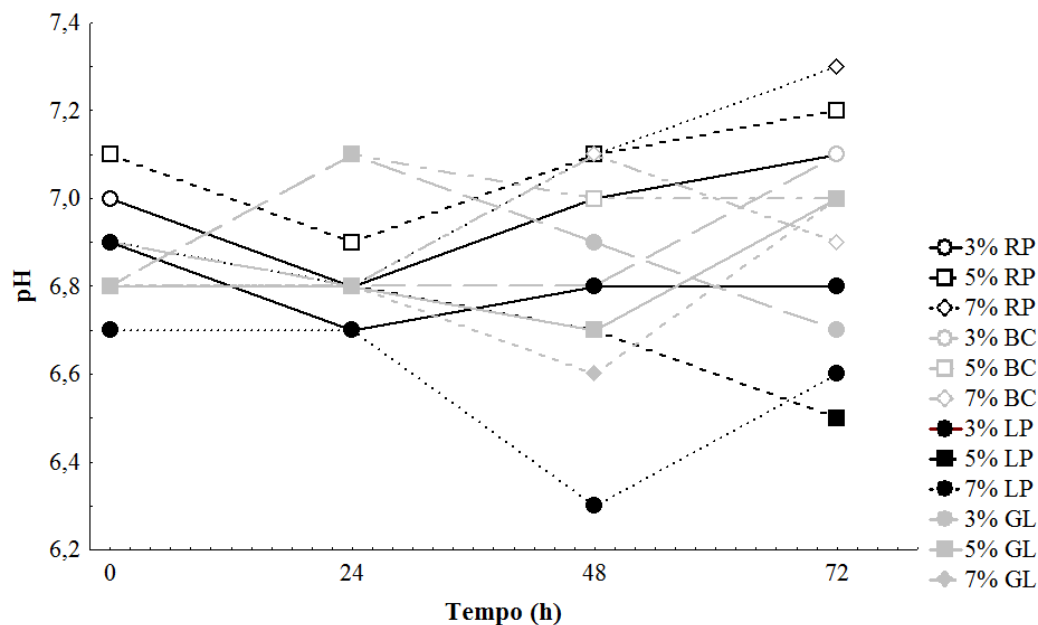
Os biossurfactantes apresentam pH ótimo de atuação dependendo do tipo de biocomposto produzido.

Figura 7 – pHs medidos durante o cultivo utilizando *Corynebacterium aquaticum* e diferentes fontes de carbono



RP: Resíduo de peixe; BC: Bagaço de cana-de-açúcar; LP: lodo de petróleo; GL: glicerina bruta.

Figura 8 – pHs medidos durante o cultivo utilizando *Corynebacterium spp.* CCT1968 e diferentes fontes de carbono



RP: Resíduo de pescado; BC: Bagaço de cana-de-açúcar; LP: lodo de petróleo; GL: glicerina bruta.

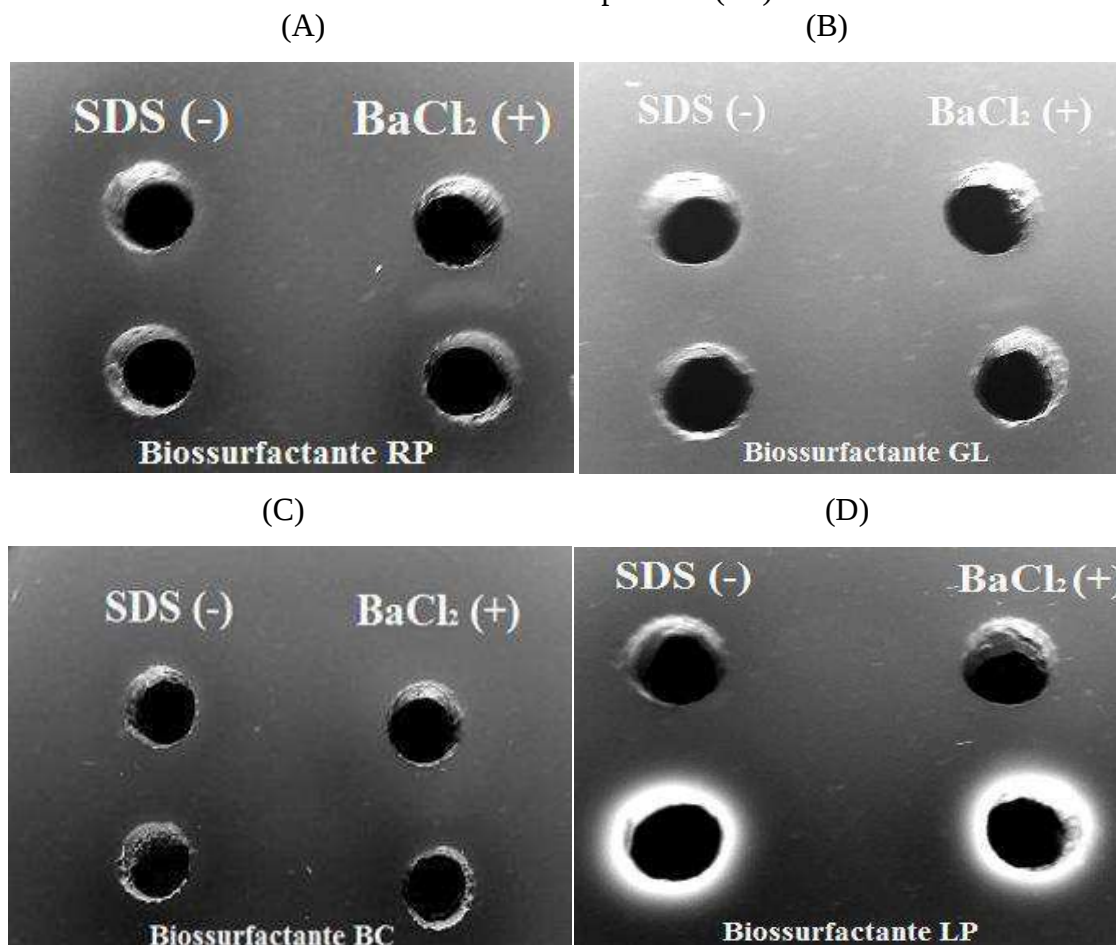
5.2.4 Determinação do caráter iônico dos biossurfactantes

A resposta do caráter iônico dos biossurfactantes é representada pela formação de um leve halo próximo ao reagente de caráter positivo ou negativo. A verificação do caráter iônico dos bioprodutos é um indicativo para aplicações futuras, principalmente, na área de remoção de compostos de carga oposta, como metais contaminantes e alguns tipos de corantes. As Figuras 9 e 10 mostram os halos obtidos ao analisar os extratos dos biossurfactantes produzidos.

A Figura 9A mostra uma linha de difusão entre o poço contendo o extrato do biossurfactante produzido a partir de resíduo de pescado e a solução catiônica de cloreto de bário indicando um caráter negativo do bioproduto devido à aproximação ao polo positivo.

O glicerol utilizado como fonte de carbono para o desenvolvimento de biossurfactante foi responsável pelo desenvolvimento de um bioproduto com caráter aniônico, como mostra a Figura 9B, pois foi formada uma linha de difusão entre o poço contendo o extrato do bioproduto e a solução de cloreto de bário (catiônica). No entanto, o cultivo realizado com glicerol pelas análises de tensão superficial e atividade emulsificante não se mostraram conclusivas da produção do bioproduto. A obtenção do halo indica a presença de um componente aniônico no meio de cultivo que utiliza o glicerol.

Figura 9 – Imagens das placas utilizadas para a determinação do caráter iônico para os extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de (A) resíduo de pescado (RP), (B) glicerina bruta (GL), (C) bagaço de cana-de-açúcar (BC) e (D) resíduo de lodo de petróleo (LP)



SDS: Dodecil sulfato de sódio; BaCl₂: Cloreto de bário.

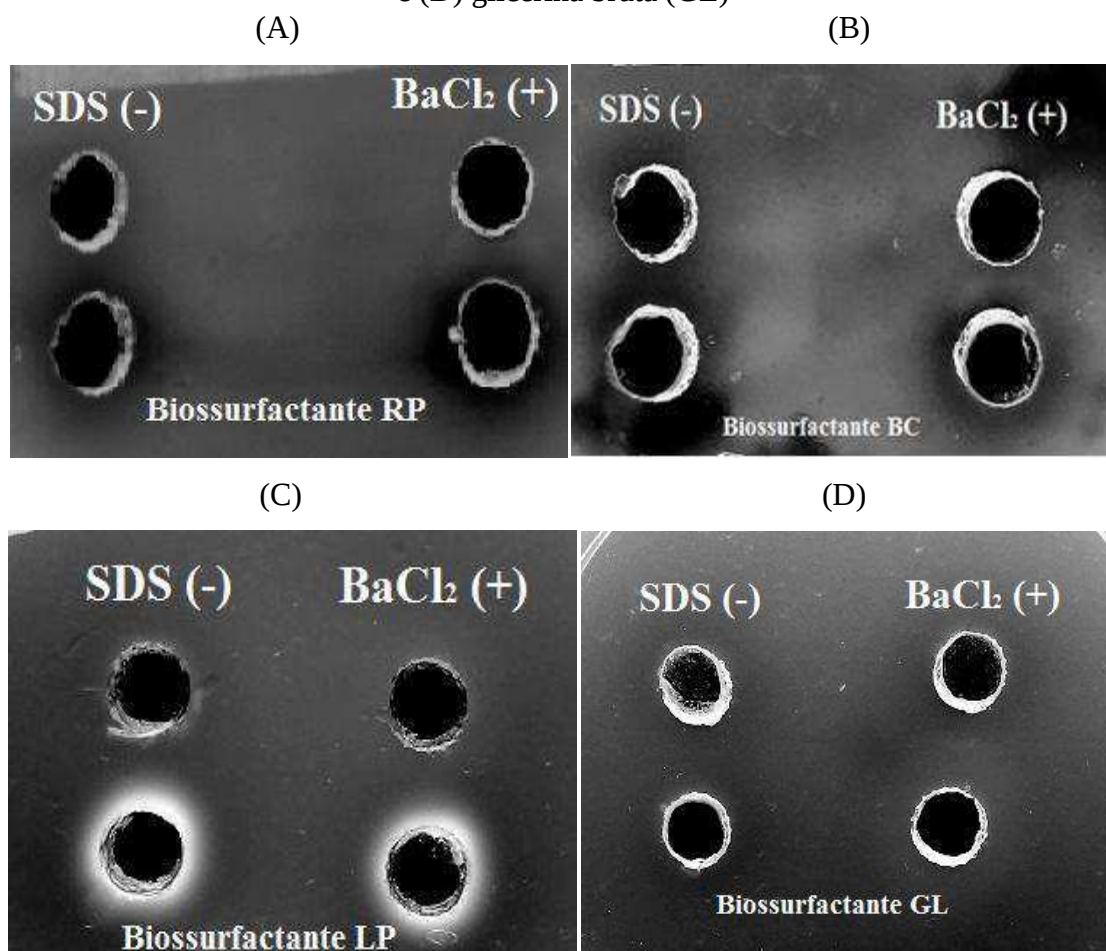
Nas Figuras 9C e 9D não foi possível visualizar a formação de linhas de difusão, portanto, não foi possível determinar o caráter iônico dos extratos dos biossurfactantes produzidos.

O extrato contendo o biossurfactante produzido a partir de bagaço de cana apresentou-se eficaz em relação as análises de tensão superficial e atividade emulsificante, no entanto, não apresentou carga quando estudado frente ao caráter iônico (Figura 9C). Segundo Krepsky (2004) existem 3 classes de biossurfactantes, aniônicos, catiônicos e os neutros. Assim, os biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana pode estar incluído no grupo de biossurfactantes que não apresentam cargas.

As Figura 10A, 10B e 10D apresentaram leves linhas de difusão em direção a solução catiônica de cloreto de bário. O que faz com que os biossurfactantes produzidos tenham

caráter aniônico. Na Figura 10C não foi possível visualizar a formação de linha de difusão, o que impossibilita a determinação do caráter iônico do biossurfactante

Figura 10 – Imagens das placas utilizadas para a determinação do caráter iônico para os extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium spp.* CCT1968 a partir de (A) resíduo de pescado (RP), (B) bagaço de cana-de-açúcar (BC), (C) resíduo de lodo de petróleo e (D) glicerina bruta (GL)



SDS: Dodecil sulfato de sódio; BaCl₂: Cloreto de bário.

Silva et al. (2010) realizaram o mesmo teste de determinação do caráter iônico do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerol como substrato e obtendo a confirmação do caráter aniônico do biossurfactante.

Meylheuc, Van Oss e Bellon-Fontaine (2001) determinaram o caráter iônico do biossurfactante produzido através de *Pseudomonas fluorescens* 495 e verificaram a difusão do biossurfactante e a formação de halos próximos as soluções de cloreto de bário e de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), ambas as soluções de caráter positivo evidenciando o caráter aniônico do bioproduto.

Embora as tensões superficiais e atividades emulsificantes dos extratos de biossurfactantes produzidos a partir de glicerol não tenha sido verificada, a determinação do caráter iônico (Figura 10D) verificou a presença de um componente com caráter aniônico no meio de cultivo contendo glicerol.

5.3 ESTABILIDADE DOS BIOSSURFACTANTES

De acordo com os resultados obtidos durante o trabalho foram escolhidos dois meios de cultivos, estes cultivos foram selecionados, principalmente, em relação à tensão superficial seguido da atividade emulsificante (Tabela 9). Os biossurfactantes selecionados foram produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado e bagaço de cana-de-açúcar nas concentrações de 3 % e em um tempo de 48 h de cultivo.

Tabela 9 – Propriedades dos biossurfactantes selecionados para a avaliação da estabilidade e armazenamento

Fonte de carbono	Tensão superficial (mN/m)	Atividade emulsificante (%)
3 % RP	27,8 ± 0,4	87,6 ± 2,7
3 % BC	33,9 ± 0,8	61,6 ± 2,5

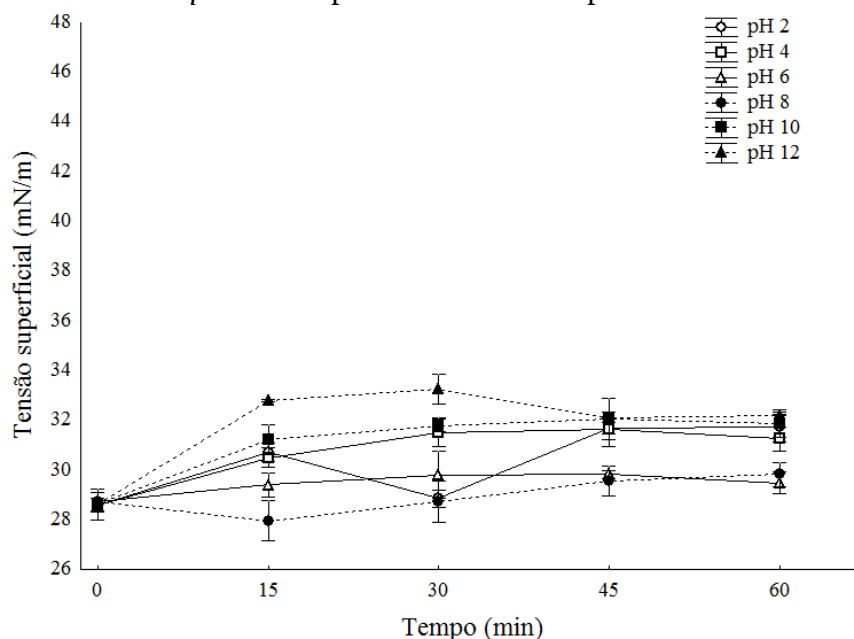
Valores de médias ± desvio padrão

5.3.1 Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes em diferentes pHs

As Figuras 11 e 12 demonstram o comportamento, em relação a diferentes pHs, dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

A partir da Figura 11 pode-se observar que em pH 8 os extratos dos biossurfactantes apresentaram a menor tensão superficial (28 mN/m). Em pH 12 os extratos dos biossurfactantes apresentaram as maiores tensões superficiais, o aumento de hidroxilas no meio pode provocar a precipitação do extrato contendo o biossurfactante e possível alteração da estrutura do biotensoativo. Os dados apresentados na Figura 11 sugerem que a melhor atuação do biossurfactante seria em pH 8 caracterizando que sua estrutura atua de forma mais eficiente em pH levemente básico. Além disto, nos pHs abaixo de 4 o biossurfactante sofreu precipitação dificultando as medidas de tensão superficial.

Figura 11 – Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado em diferentes pHs



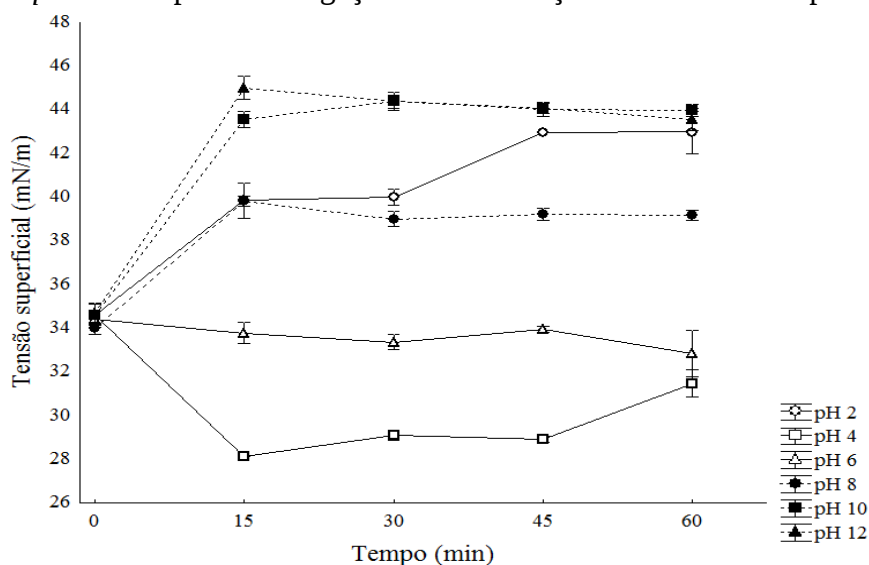
Vilela et al. (2014) ao produzirem biossurfactante por *Brevibacterium luteolum* utilizando glicerol como substrato, avaliaram a estabilidade do mesmo em diferentes pHs, e constataram que o biotensioativo precipitava em pH 4 e menores que este. Outra observação dos autores foi que o bioproduto em pH 12 aumentava a tensão superficial em 36 % indicando perdas da atividade do bioproduto.

Embora tenham ocorrido alterações das tensões superficiais conforme eram modificados os pHs, em todos os estudos as tensões superficiais mantiveram-se abaixo de 40 mN/m, o que indica que o biossurfactante é eficiente em uma ampla faixa de pH.

Segundo Rakeshkumar et al. (2013) o pH desempenha um papel muito importante na aplicação dos biossurfactantes em processos de remediação de metais. Em pHs mais baixos as moléculas de biossurfactantes são protonadas e isto promove o retardo da ligação dos íons metálicos com a molécula do biossurfactante. Em pH neutro a atuação dos biossurfactantes é favorecida.

Em relação ao comportamento do biossurfactante produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 12) a menor tensão superficial obtida foi de 28 mN/m em pH 4. No entanto, em pH 6 o biossurfactante permaneceu com menores variações de tensão ao longo do tempo. O fenômeno que causa essa alteração de diminuição da tensão superficial em pH 4 (ácido) está diretamente ligado a estrutura do biossurfactante produzido.

Figura 12 – Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes pHs



Em relação ao comportamento do extrato do biossurfactante produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 12) a menor tensão superficial obtida foi de 28 mN/m em pH 4. No entanto, em pH 6 o extrato do biossurfactante permaneceu com menores variações de tensão ao longo do tempo. O fenômeno que causa essa alteração de diminuição da tensão superficial em pH 4 (ácido) está diretamente ligado a estrutura do biossurfactante produzido.

Vilela et al. (2014) menciona que os biossurfactantes possuem faixas ótimas de atuação, em geral em pHs próximos a neutralidade. Em pHs mais ácidos os biossurfactantes tendem a precipitar, sendo que uma das formas de extração de alguns tipos de biossurfactantes é por meio da diminuição do pH para pHs próximos de 2.

Embora em pHs 2, 10 e 12 os extratos dos biossurfactantes tenham desestabilizado e sofrido um grande aumento das tensões superficiais, nos demais pHs (4, 6 e 8) o biossurfactante manteve-se abaixo de 40 mN/m sendo ainda considerado um biossurfactante eficiente.

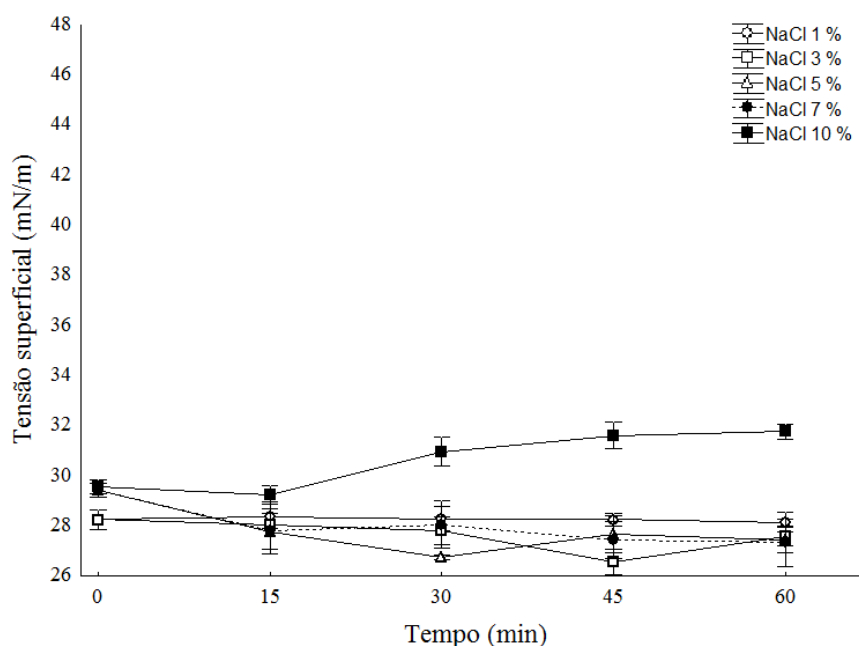
5.3.2 Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes em diferentes concentrações salinas

As Figuras 13 e 14 demonstram o comportamento dos extratos dos biossurfactante em relação a diferentes concentrações de NaCl.

A partir do estudo apresentado na Figura 13 foi possível observar que o extrato do biossurfactante produzido a partir de resíduo de pescado se mostrou com melhor atuação (menor tensão superficial) em concentrações de sal de 3 e 5 %. Nas concentrações de 1, 3, 5, e

7 % de NaCl o biossurfactante mostrou-se estável apresentando baixa variação das tensões superficiais ao longo do tempo. A concentração de 10 % de NaCl provocou um aumento da tensão superficial do biossurfactante, o que provoca diminuição da sua atuação como tensoativo. No entanto, todas as concentrações de NaCl testadas não foram suficientes para aumentar as tensões do biossurfactante para valores acima de 40 mN/m.

Figura 13 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado em diferentes concentrações salinas



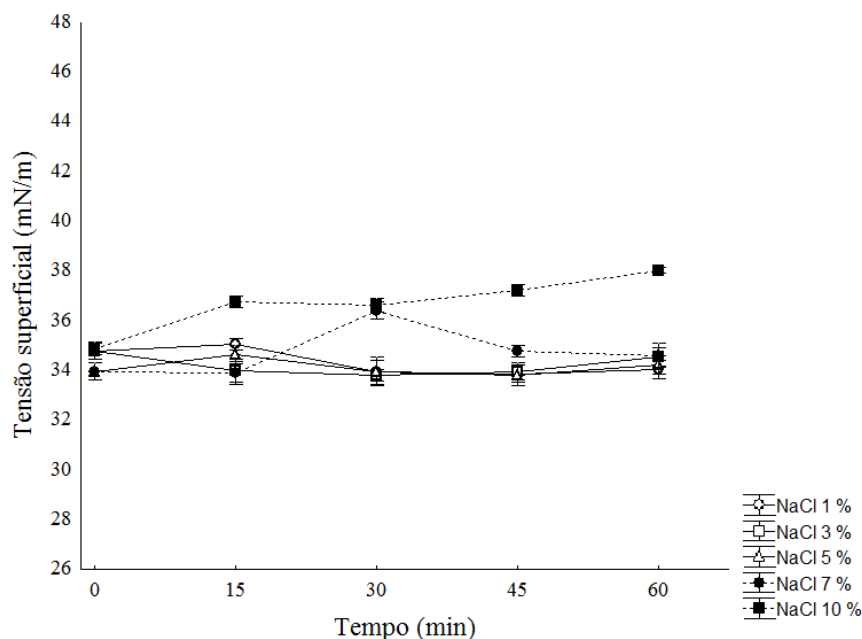
Segundo Vilela et al. (2014) embora os biossurfactantes sejam testados a concentrações de até 20 % de NaCl a eficiente atuação destes biocompostos em concentrações próximas a 3,5 % promovem a possibilidade de utilização em processos de biorremediação de ambientes marinhos. Ambos biossurfactantes desenvolvidos neste estudo mostraram-se com boa capacidade de atuação na condição de concentração de sal mencionada pelo autor.

Os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar mostraram-se com poucas alterações na tensão superficial quando submetidos a concentrações de sal de 1, 3 e 5 % (Figura 14). A concentração de 10 % de NaCl promoveu um aumento da tensão superficial dos extratos indicando a desestabilização do bioproduto.

Embora não se saiba qual a estrutura dos biossurfactantes produzidos. Segundo Silva et al. (2010) biossurfactantes com caráter aniônico como os ramnolipídeos apresentam aumento de tensão superficial com o aumento da concentração de sal. Esse comportamento se

deve a carga negativa do biossurfactante a ser protegida por íons Na^+ formando uma dupla camada na presença de NaCl, isso promove a formação de uma monocamada e consequente diminuição da tensão superficial.

Figura 14 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações salinas



Embora não se saiba quais tipos de biossurfactantes foram obtidos a partir de resíduo de pescado ou bagaço de cana, a maioria dos biossurfactantes é alterada em presença de sal, uma vez que ao aumentar a concentração de sal do meio ele é saturado e isto impede a determinação das tensões superficiais.

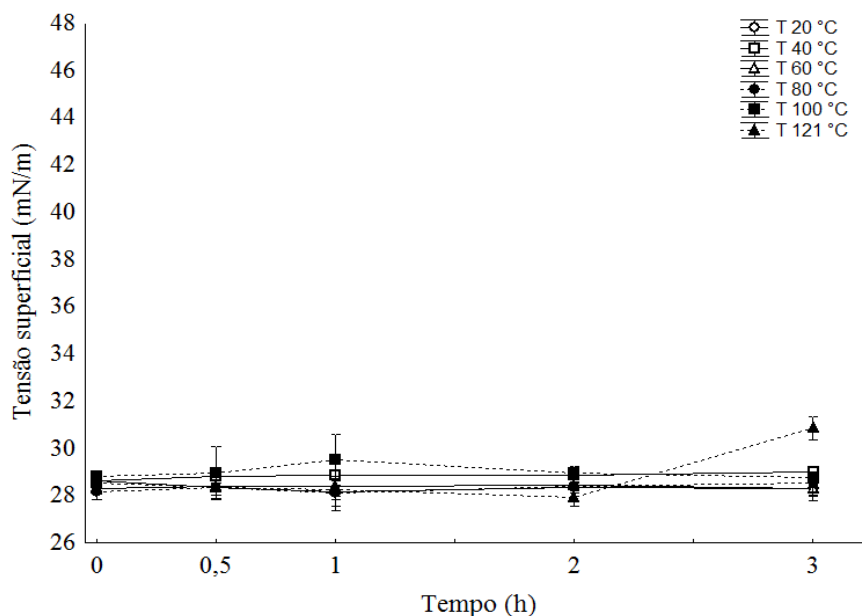
Segundo Vaz et al. (2012) e Silva et al. (2010) a estabilidade dos biossurfactantes, principalmente em uma ampla faixa de pH e temperatura direciona estes bioprodutos a aplicações como biorremediação de locais contaminados por petróleo. Estes locais, muitas vezes, requerem produtos com ótima atuação em condições ambientais drásticas.

5.3.3 Estabilidade dos extratos dos biossurfactantes em diferentes temperaturas

A Figura 15 mostra que os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado mostraram-se termoestáveis em temperaturas de 20 até 100 °C durante o período de 3 h. O extrato do biossurfactante submetido a temperatura de 121 °C no tempo de 2 h apresentou redução da tensão superficial, isto pode ter ocorrido devido a liberação do biotensoativo que

poderia ter sido produzido intracelularmente e que com a ação do calor na célula, esta tenha sido rompida e o bioproduto liberado no meio.

Figura 15 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado frente a diferentes temperaturas

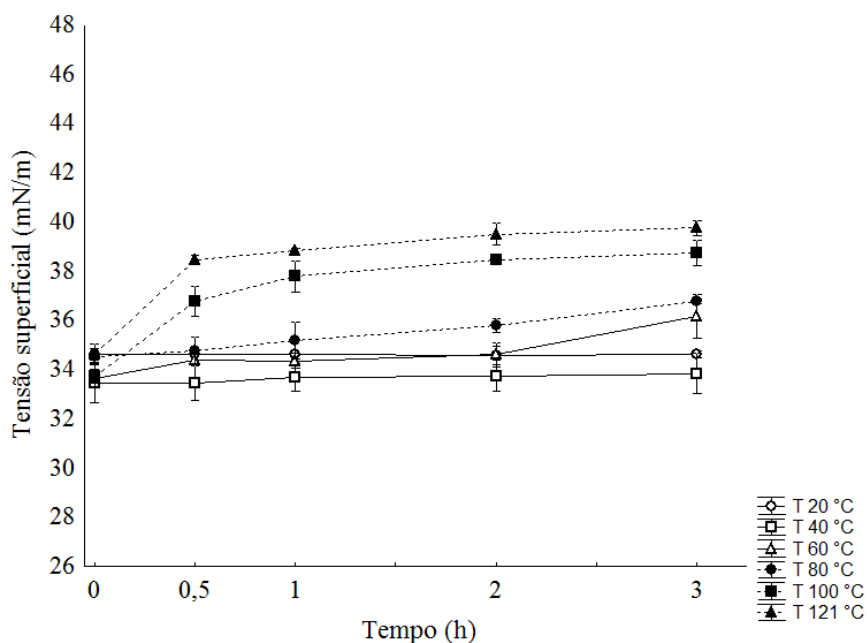


No tempo de 3 h de verificação da estabilidade o extrato contendo o biossurfactante submetido a temperatura de 121 °C apresentou aumento da tensão superficial. Embora este aumento ainda mantenha o biossurfactante dentro de condições ótimas isso pode ter ocorrido devido a desestabilização da estrutura do bioproduto.

A estabilidade dos biossurfactantes é um ponto importante quando se pensa em produção em maior escala do produto. Este estudo mostra que o biossurfactante pode ser armazenado em temperatura ambiente diminuindo o uso de etapas como a refrigeração. A estabilidade do biossurfactante em relação a temperatura de 121 °C mostra que o biotensioativo pode ser autoclavado para a inativação de células sem nenhum prejuízo a sua atuação (se considerarmos que o tempo de exposição no processo de esterilização, em geral, é de 15 a 20 min e a tensão superficial praticamente não sofreu alteração).

Os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana se mostraram estáveis nas temperaturas de 20 e 40 °C (Figura 16). A partir de 60 °C os extratos dos biossurfactantes apresentaram aumento da tensão superficial, isto indica que os biossurfactantes diminuem sua capacidade de tensoativo em temperaturas a partir de 60 °C, porém continuam com sua funcionalidade, pois mesmo depois de 3 h de temperaturas elevadas estes ainda apresentam tensão superficial abaixo de 40 mN/m.

Figura 16 – Tensões superficiais dos extratos dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de bagaço de cana-de-açúcar frente a diferentes temperaturas



Rakeshkumar et al. (2013) produziram biossurfactantes por *Pseudomonas gessardii* usando bagaço de cana e testaram o bioproduto quanto a estabilidade em diferentes pHs e temperatura. Os autores verificaram que o biotensoativo era termoestável até 100 °C. A 150 °C a tensão superficial foi drasticamente alterada de 44 para 59 mN/m.

Lotfabad et al. (2009) produziram biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* MR01 e avaliaram a estabilidade dos biossurfactantes produzidos em diferentes temperaturas (4, 25, 70, 100 e 121 °C). O autor verificou a termoestabilidade dos biossurfactantes produzidos em temperaturas de 4 até 121 °C.

Vaz et al. (2012) produziram biossurfactantes por *Bacillus subtilis* EG1 isolado a partir de óleo e avaliaram a estabilidade do bioproduto em relação ao pH, temperatura e concentração de sal. Os autores observaram que as temperaturas (20, 37, 46 e 121 °C) não afetaram a tensão superficial do bioproduto, o qual manteve sua tensão praticamente inalterada.

5.4 ARMAZENAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVOS CONTENDO OS BIOSSURFACTANTES

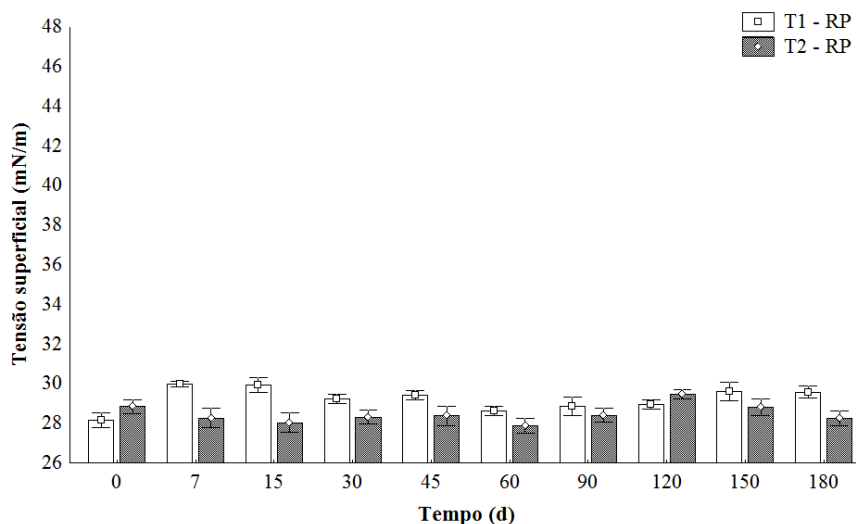
A partir da seleção dos biossurfactantes foram realizados 2 tratamentos em cada meio de cultivo contendo os biossurfactantes. Tratamento 1 (T1) meio de cultivo não autoclavado e Tratamento 2 (T2) meio de cultivo autoclavado.

As Figuras 17 e 18 ilustram o comportamento das tensões superficiais dos extratos do biossurfactantes produzidos por resíduo de pescado e bagaço de cana frente aos tratamentos T1 e T2.

O estudo de estabilidade foi realizado para que se pudesse verificar o comportamento dos extratos dos biossurfactantes em relação ao tratamento térmico, vida útil e características de armazenamento.

A Figura 17, de uma maneira geral, mostra que os extratos produzidos a partir de resíduo de pescado quando submetido ao processo térmico de esterilização consegue manter a tensão superficial ao longo do tempo. Ao comparar os extratos dos biossurfactantes esterilizados (T2 – RP) com os que não sofreram processo térmico (T1 – RP), os extratos autoclavados (T2 – RP) apresentaram menores tensões superficiais do que os não esterilizados (T1 – RP). No entanto, se tratando de estabilidade ambos apresentaram baixas alterações de estabilidade durante o período de 6 meses e mantiveram valores de tensão superficial abaixo de 30 mN/m.

Figura 17 – Acompanhamento das tensões superficiais para os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado durante os tratamentos 1 e 2.



T1 – RP: Tratamento 1 extrato do biossurfactante produzido a partir de resíduo de pescado não autoclavado; T2 – RP: Tratamento 2 extrato do biossurfactante produzido a partir de resíduo de pescado autoclavado.

A surfactina é um biossurfactante produzido comercialmente. É considerado um bioproduto com ótimas características de tensão superficial, pois promove a diminuição da

tensão da água de 72 mN/m para valores abaixo de 30 mN/m (BARROS et al., 2007). Esta observação evidencia que o extrato contendo o biossurfactante produzido a partir de resíduo de pescado, após o período de 6 meses de armazenamento, sem sofrer processo de esterilização e sem refrigeração mantiveram os valores de tensão superficial próximos a 30 mN/m, similar ao reportado pelos autores quanto as características de tensão superficial pertencentes a surfactina.

O processo de armazenamento é uma etapa de produção que requer gastos para manter o produto em condições ideais. A possibilidade de manter o biossurfactante em condições de temperatura ambiente torna-se atrativo, uma vez, não necessita de armazenamento refrigerado.

A estabilidade do bioproduto em relação a esterilização é uma característica importante. Em processos envolvendo alimentos é essencial que as células dos micro-organismos estejam inaptas para que não se desenvolvam nos produtos. Porém, em processos de biorremediação o uso de micro-organismo, em certas ocasiões, é interessante, principalmente em processos de bioaugmentação. No entanto, em algumas situações a utilização de biossurfactante contendo células pode aumentar a proliferação de micro-organismos não característicos do ambiente, dificultando a atuação da microbiota nativa.

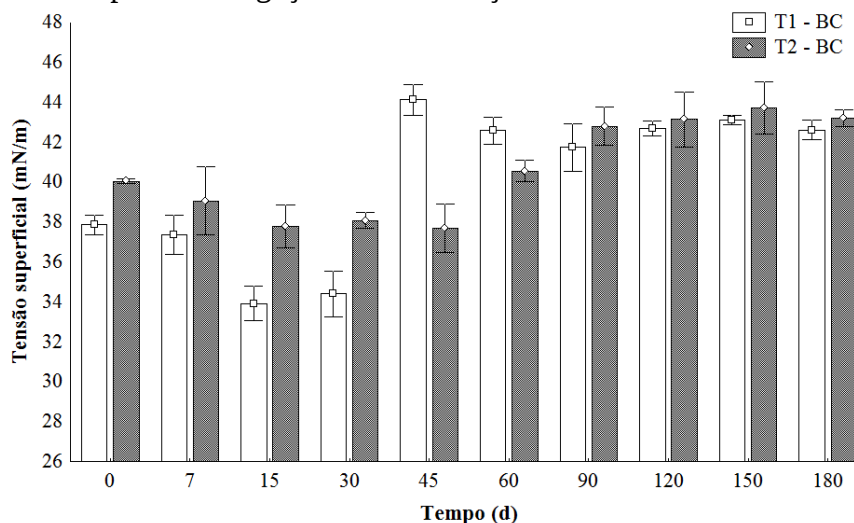
Ao observar a Figura 18 é possível verificar que os extratos contendo os biossurfactantes produzidos a partir de BC quando submetidos ao processo térmico apresentaram aumento da tensão superficial em aproximadamente 6 %, quando comparado, ao valor de tensão superficial dos extratos que não foram submetidos à ação do calor no tempo 0.

Embora um extrato tenha sofrido o processo de esterilização e o outro não a partir de 30 dias de armazenamento ambos começaram a sofrer desestabilização. Ao fim do período de avaliação (180 dias) as tensões superficiais se igualaram independente do processo térmico.

De acordo com Vilela et al. (2014) o tempo de autoclavagem é importante e provoca alterações no biossurfactante. O autor produziu biossurfactantes utilizando *Brevibacterium luteolum* isolado de meio marinho. A tensão superficial dos biossurfactantes era de 27,1 mN/m e após passar pelo processo de esterilização passou para 30,4 mN/m, comportamento similar ao encontrado neste estudo.

Silva et al. (2010) ao produzir biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 a partir de glicerol residual verificou que os biossurfactantes mantiveram suas tensões superficiais estáveis mesmo quando submetidos à 121°C.

Figura 18 – Acompanhamento das tensões superficiais para os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar durante os tratamentos 1 e 2



T1 – BC: Tratamento 1 extrato do biossurfactante produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar não autoclavado; T2 – BC: Tratamento 2 extrato do biossurfactante produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar autoclavado.

Ambos biossurfactantes estudados apresentaram diferenças em relação ao processo de esterilização e ao tempo de armazenamento. Os extratos contendo os biossurfactantes produzidos a partir de pescado mantiveram-se estáveis pelo período de 180 dias, tanto após sofrer o processo de esterilização quanto ser armazenado sem o processo. No entanto, os extratos produzidos a partir de bagaço de cana mostraram-se instáveis a partir de 30 dias de armazenamento, tanto para o extrato do biossurfactante esterilizado quanto o que não passou por processo de esterilização.

A partir disto, se pode constatar que os extratos dos biossurfactantes provenientes de resíduo de pescado apresentam maior estabilidade, em relação ao processo térmico e as condições de armazenamento do que os extratos de biossurfactantes provenientes de bagaço de cana. Acredita-se que este comportamento está diretamente relacionado a estrutura dos biossurfactantes que são diretamente afetadas por estes parâmetros.

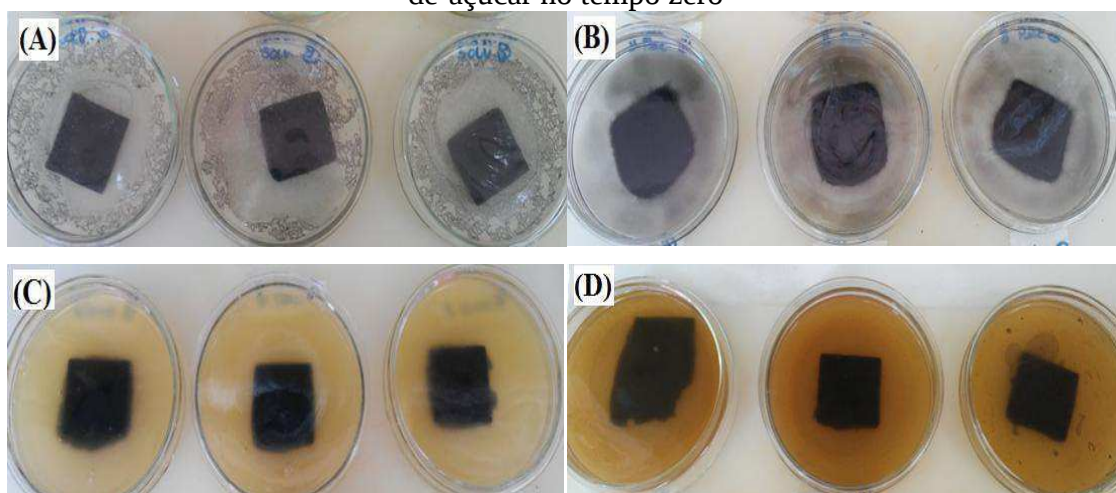
5.5 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

No ensaio para a remoção de tintas e adsorção de corantes foram utilizados os extratos contendo os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* a partir de 3 % de resíduo de pescado (cultivo de 48 h) e a partir de 3 % bagaço de cana (cultivo de 48 h).

5.5.1 Remoção de tintas

A Figura 19 demonstra o momento em que as placas cobertas por tintas foram imersas nas respectivas soluções. É possível observar que ao imergir as placas em água parte da tinta ficou na superfície da água de forma não diluída, ao passo que as placas que foram imersas em solvente (água-rroz) apresentaram uma pequena parcela de tinta diluída no solvente. As placas imersas no meio contendo os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado, inicialmente, não interagiram com o bioproduto, porém, as placas que continham os extratos produzidos a partir de bagaço de cana, já mostraram uma pequena parcela de tinta se desprendendo da placa e sendo solubilizada no meio (Figura 19D).

Figura 19 – Placas de metal cobertas com tinta e imersas em (a) água, (b) solvente, (c) extrato do biossurfactante de resíduo de pescado e (d) extrato do biossurfactante de bagaço de cana-de-açúcar no tempo zero

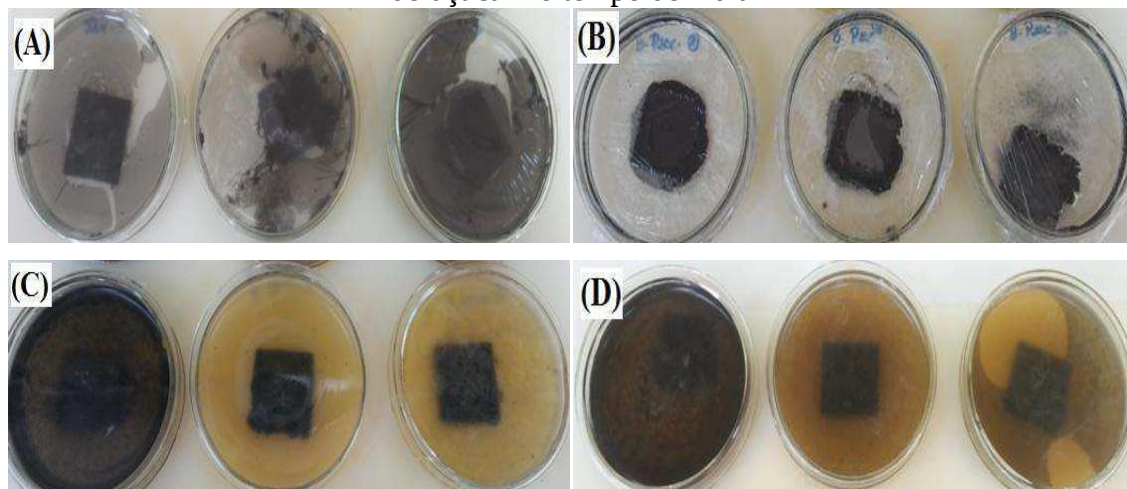


A Figura 20 apresenta o comportamento das placas contendo a tinta após 1 dia de aplicação.

A Figura 20A mostra-se diferente do tempo zero de análise (Figura 19A). Visualmente percebe-se o aumento de tinta presente no meio, no entanto, a tinta não encontra-se diluída e sim em uma fina película na superfície da água. A Figura 20B ilustra que não há tinta diluída no meio, porém, boa parte da tinta foi removida da superfície e manteve-se aderida aos cantos das placas metálicas.

As placas metálicas imersas nos extratos contendo os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado (Figura 20C) mostram que em um dos experimentos, foi criada uma película de tinta que cobriu a superfície do meio mostrando-se insolúvel no biossurfactante. Os demais ensaios mantiveram-se aparentemente inertes.

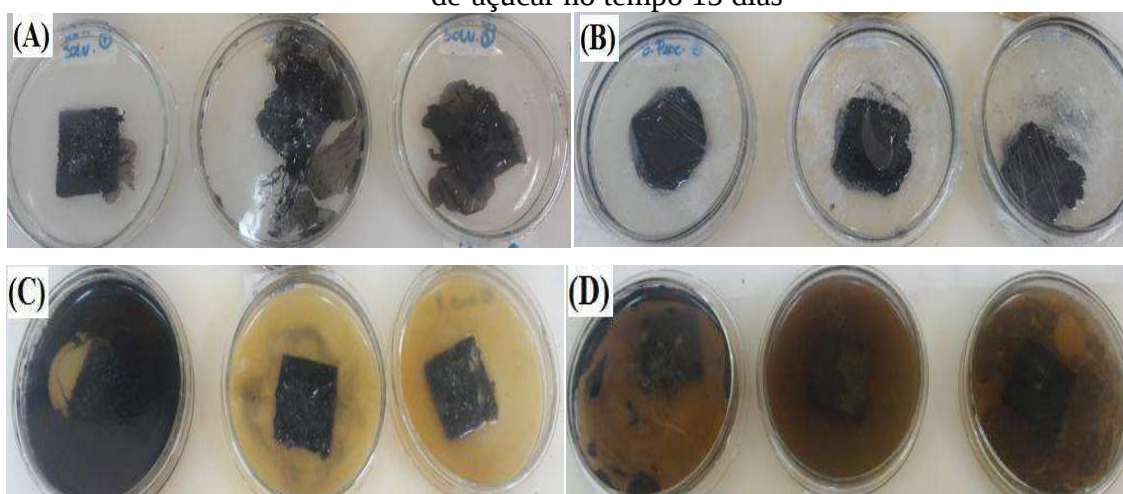
Figura 20 – Placas de metal cobertas com tinta e imersas em (a) água, (b) solvente, (c) extrato do biossurfactante de resíduo de pescado e (d) extrato do biossurfactante de bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 1 dia



O ensaio apresentado na Figura 20D mostra uma parcela da tinta difundida no meio. Em um dos ensaios a tinta apresenta-se como uma fina camada na superfície do líquido, no entanto, esta camada não se apresenta inteira (como na Figura 20A), são visualizadas apenas pequenas gotículas que constituem essa película.

A Figura 21 ilustra o comportamento dos ensaios de remoção de tinta em um período de 15 dias.

Figura 21 – Placas de metal cobertas com tinta e imersas em (a) água, (b) solvente, (c) extrato do biossurfactante de resíduo de pescado e (d) extrato do biossurfactante de bagaço de cana-de-açúcar no tempo 15 dias



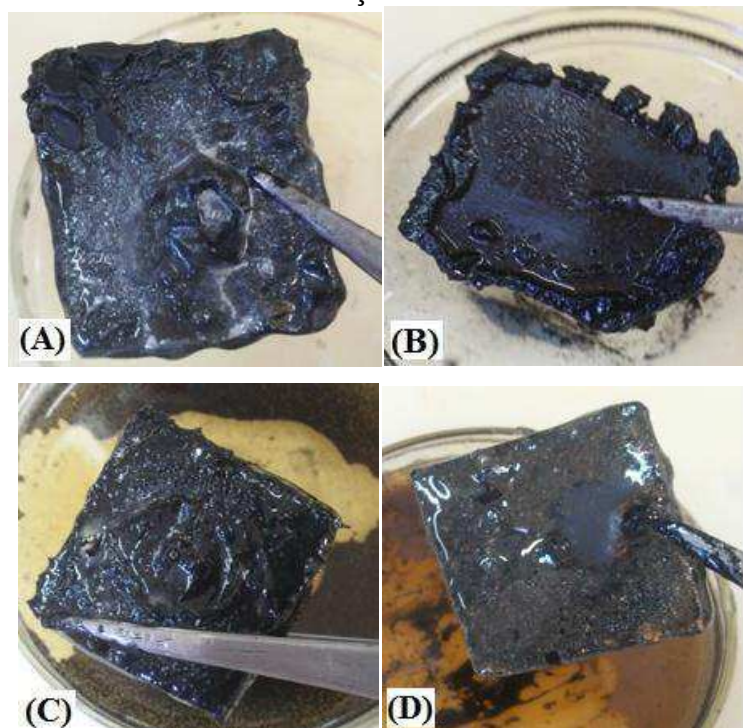
Poucas modificações foram notadas entre as avaliações de 3, 5 e 10 dias de estudo. No entanto, o ensaio que utiliza o extrato do biossurfactante produzido a partir de pescado se nota

o aumento de tinta diluída no meio (Figura 21C). O ensaio que utiliza os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana, se comparado, com o tempo de 1 dia de aplicação verifica-se que o meio está mais escuro. Embora se tenha tinta não solubilizada na superfície, parte desta tinta foi solubilizada no meio (Figura 21D).

A Figura 22 apresenta a remoção de uma das placas metálicas de cada um dos ensaios. A partir da Figura 22A verifica-se que a tinta permaneceu aderida à superfície de forma irregular. Este comportamento já era esperado, uma vez, que a água não apresenta capacidade de solubilizar esse tipo de material.

Ao observar a Figura 22B verifica-se a remoção da tinta aderida na superfície pelo solvente. No entanto, a tinta não permaneceu diluída no meio e sim aderida aos cantos da placa metálica.

Figura 22 – Placas de metal no momento da retirada após os 15 dias de processo. (a) Placa imersa em água, (b) placa imersa no solvente, (c) placa imersa no extrato do biossurfactantes de resíduo de pescado e (d) placa imersa no extrato do biossurfactantes de bagaço de cana-de-açúcar



A Figura 22C mostra que as placas que permaneceram imersas nos extratos contendo os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado continuaram com a superfície coberta por tinta, no entanto, com uma camada visivelmente mais fina do que no tratamento contendo água.

As placas removidas do ensaio contendo os extratos dos biossurfactantes produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar (Figura 22D) apresentaram alguns pontos de remoção total da tinta na superfície. No entanto, os pontos que ainda continham a tinta, se mostraram com uma coloração mais clara e pegajosa, indicando que a maior parte da tinta foi removida.

Segundo Mulligan (2005) os biossurfactantes apresentam diversos potenciais de utilização na indústria. Dentre estas possibilidades a aplicação na solubilização de tintas. No entanto, na literatura não se tem informações sobre a utilização de biossurfactantes como agentes de remoção de tintas de superfície. Sabe-se que os biossurfactantes são moléculas capazes de solubilizar uma série de componentes hidrofóbicos, desde óleos vegetais até produtos de origem petrolífera.

As tintas do tipo esmalte sintético apresentam em sua composição química, solventes, aditivos, pigmentos orgânicos e não orgânicos e resinas alquílicas, que são resinas compostas por diversos tipos de ácidos graxos (ABNT, 2010). A composição deste produto é bastante complexa, porém acredita-se que é possível a utilização dos biossurfactantes por causa de suas propriedades emulsificantes e de adsorção de alguns compostos.

A literatura mostra estudos envolvendo a utilização de biossurfactantes para remoção de componentes hidrofóbicos de meio sólido, em geral areia. Os resultados obtidos, dependendo do tipo de componente hidrofóbico, pode remover até 80 % do componente (LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2009).

Sarubbo, Luna e Rufino (2015) realizaram um estudo de remoção de componentes hidrofóbicos de pedra porosa. A pedra foi imersa em óleo de motor contaminante de concentração conhecida. Após sofreu lavagens com diferentes concentrações dos biossurfactantes e agitação manual. Por fim, o resíduo obtido durante as lavagens foi quantificado gravimetricamente. O autor obteve 70 % de remoção do óleo de motor.

Acredita-se que este teste visual de remoção de tintas foi um passo inicial no estudo da aplicação de biossurfactantes na área de remoção de diversos tipos de componentes hidrofóbicos de superfícies. Embora o resíduo de bagaço de cana tenha se mostrado promissor como agente de remoção de tintas, mais estudos devem ser desenvolvidos nesta área de forma a quantificar a remoção destes compostos. Também, é importante salientar que se tivesse sido aplicada pressão na lavagem das placas, provavelmente os resultados teriam sido mais visíveis.

5.5.2 Adsorção de corantes

O ensaio de adsorção de corantes foi baseado na capacidade dos biossurfactantes em removerem íons. O mecanismo de remoção dos biossurfactantes é através da ligação de íons presentes nos biossurfactantes com os íons de carga oposta presente nos contaminantes. Assim, acreditava-se que os biotensoativos seriam capazes de atuar na remoção do corante vermelho 40, uma vez, que este apresenta em sua estrutura íons Na^+ .

As Tabelas 10 e 11 mostram as concentrações de corantes obtidos através do processo de adsorção dos filmes produzidos com biossurfactantes.

Tabela 10 – Concentração de corante adsorvido em 100 mg de filme

	Concentração de corante adsorvido (mg/L)		
	pH 6	pH 7	pH 8
Filme de BS resíduo de pescado	$4,5^{a,A} \pm 0,11$	$4,6^{a,A} \pm 0,09$	$4,5^{a,A} \pm 0,11$
Filmes de BS de bagaço de cana	$4,6^{a,A} \pm 0,11$	$4,5^{a,A} \pm 0,10$	$4,4^{a,A} \pm 0,14$
Filme Padrão	$4,5^{a,A} \pm 0,12$	$4,5^{a,A} \pm 0,09$	$4,5^{a,A} \pm 0,08$

Valores de médias $\pm$ desvio padrão. Em uma mesma linha, médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes, em uma mesma coluna para o mesmo resíduo, apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

A partir dos dados obtidos nas Tabelas 10 e 11 foi possível observar que os filmes não apresentaram diferenças no processo de adsorção. O filme padrão sem ambos biossurfactantes adsorveu a mesma quantidade de corante do que os filmes contendo o biotensoativos. Acredita-se que os biossurfactantes tiveram sua estrutura bloqueada pelo processo de formação do filme. Embora o ágar seja um polissacarídeo que não apresenta interação com outras matérias-primas, neste caso, a utilização do mesmo com biossurfactante não foi eficiente.

Tabela 11 – Concentração de corante adsorvido em 200 mg de filme

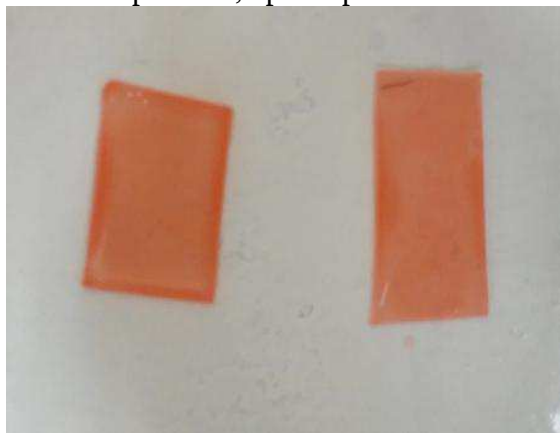
	Concentração de corante adsorvido (mg/L)		
	pH 6	pH 7	pH 8
Filme de BS resíduo de pescado	$5,0^{a,A} \pm 0,09$	$5,1^{a,A} \pm 0,13$	$5,0^{a,A} \pm 0,11$
Filmes de BS de bagaço de cana	$5,1^{a,A} \pm 0,11$	$4,9^{a,A} \pm 0,12$	$5,0^{a,A} \pm 0,09$
Filme Padrão	$5,0^{a,A} \pm 0,12$	$5,^{a,A} \pm 0,09$	$5,1^{a,A} \pm 0,11$

Valores de médias $\pm$ desvio padrão. Em uma mesma linha, médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias com letras maiúsculas diferentes, em uma mesma coluna para o mesmo resíduo, apresentam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Outro fator que pode ter influenciado no processo de adsorção do corante é a estrutura do corante utilizado. Embora o corante vermelho 40 apresente íons Na^+ , existem mais componentes ligados entre si para formar a estrutura molecular do corante. Acredita-se que isso possa ter dificuldade a atuação do biossurfactante no processo de adsorção do corante.

A Figura 23 mostra as tiras de filmes após o processo de adsorção.

Figura 23 – Tiras dos filmes produzidos utilizando o extrato do biossurfactante obtido a partir de resíduo de pescado, após o processo de adsorção



A partir da Figura 23 se pode observar que os filmes utilizados no ensaio adsorveram o corante vermelho 40, uma vez, que passaram a assumir a coloração da solução que foram imersos.

Embora não tenham sido verificados resultados conclusivos, mais estudos deste âmbito devem ser realizados, pois seria interessante o desenvolvimento de um produto com capacidade de retirar corantes ou metais de um meio e após estes também serem retirados do ambiente, diminuindo assim a contaminação e a toxicidade de compostos utilizados para este fim.

6 CONCLUSÃO

A bactéria *Corynebacterium aquaticum* mostrou ser eficiente na produção de biossurfactantes a partir de resíduo de pescado e bagaço de cana-de-açúcar. Os biotensoativos apresentaram redução da tensão superficial para 27,8 e 33,9 mN/m e capacidade emulsionante de 87,6 e 61,6 %, respectivamente. No entanto, para os substratos de lodo de petróleo e glicerol a atuação do micro-organismo não foi satisfatória.

A *Corynebacterium spp* apresentou produção de biossurfactantes apenas para o meio contendo resíduo de pescado. A tensão superficial obtida por este bioproduto foi de 28,5 mN/m e a atividade emulsionante não foi conclusiva.

O caráter iônico dos biocompostos foi outro parâmetro avaliado neste estudo. Os biossurfactantes produzidos pela *Corynebacterium aquaticum* a partir de resíduo de pescado e glicerol apresentaram caráter aniônico e os biossurfactantes produzidos pela *Corynebacterium spp.* a partir resíduo de pecado e bagaço de cana-de-açúcar também apresentaram caráter aniônico.

A avaliação dos bioprodutos em relação à estabilidade em diferentes pHs, indicou que a melhor atuação dos biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado foi em pH 8, no entanto, para os biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana o melhor pH de atuação foi pH 4. Em relação à aplicação de calor os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado sofreram poucas alterações nas temperaturas avaliadas. Porém, os biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana, mostraram-se estáveis até 40 °C.

O comportamento dos biossurfactantes avaliados frente a diferentes concentrações salinas indicou que ambos biossurfactantes avaliados mostraram-se estáveis em até 7 % de NaCl. Para a concentração de 10 % de NaCl a atividade destes compostos foi reduzida.

A avaliação do armazenamento dos biossurfactantes juntamente com o meio de cultivo com e sem o processo de esterilização, mostrou que os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de pescado apresentaram-se estáveis durante os 6 meses de avaliação. Os biossurfactantes produzidos a partir de bagaço de cana apresentaram-se estáveis até 30 dias de armazenamento, após apresentaram alteração da sua atividade.

O estudo de remoção de tintas mostrou que os biossurfactantes produzidos a partir de resíduo de bagaço de cana-de-açúcar apresentaram potencial de utilização em processos envolvendo a remoção de tinta do tipo esmalte sintético. No entanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para que se possa avaliar de uma forma mais precisa a atuação desde biocomposto.

A avaliação da remoção de corantes não apresentou resultados satisfatórios. A utilização dos biossurfactantes na forma de filme junto com um polissacarídeo pode ter provocado a inativação da parte hidrofílica do biossurfactante, provavelmente responsável pela sua atuação no processo de adsorção.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outros tipos de resíduos para a produção de biossurfactantes por *Corynebacterium aquaticum*;
- Desenvolver métodos para a avaliação da remoção de tintas pelos biotensoativos;
- Aplicar estes compostos em processos de remoção de componentes hidrofóbicos de solos contaminados;
- Determinar a CMC para os biossurfactantes produzidos;
- Identificar os biossurfactantes produzidos por cada tipo de substrato;
- Verificar a atividade antimicrobiana nos biossurfactantes;
- Aplicar os biossurfactantes na remoção de metais;
- Verificar a produção dos biossurfactantes alterando o pH do meio de cultivo;
- Avaliar o comportamento dos biossurfactantes após passarem por processo de secagem;
- Estudar a possibilidade de ampliação de escala;
- Avaliar a adsorção de corantes utilizando outra matriz para a formulação dos filmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma ABNT 11702 de julho de 2010 da ABNT – Tipo 4.2.1.1 T**, 2010.

AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AGUIAR, G. P. S. **Produção de biossurfactante e co-produção de lipase a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, 2013.

AGUIAR, G. P. S.; LIMBERGER, G. M.; SILVEIRA, E. L. Alternativas tecnológicas para o aproveitamento resíduos provenientes da industrialização de pescados. **Revista Eletrônica da UNIVAR**, v. 1, p. 219–225, 2014.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013.

ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade - Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17a ed Gaithersburg: AOAC International; 2000.

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

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÍSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409–414, 2007.

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

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 98, p. 354–364, 2015.

BRASIL. ANB. Associação Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>. Acesso em: 15 de fev. 2016, 15:47:53.

- BRASIL. CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>. Acesso em: 15 de fev. 2016, 15:34:45.
- BRASIL. MAP. Ministério da Agricultura e Pesca. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/>. Acesso 30 de jan. 2016, 10:46:32.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids Surfaces A**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BRODERICK L. S.; COONEY J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from fresh water ecosystems. **Developments in Industrial Microbiology**, v, 23, p. 425-434, 1982.
- BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* spp.: Estudos de produção e caracterização**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 261-280, 2010.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.
- 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, p. 947-954, 2013.
- DELEU, M.; PAQUOT, M. Recursos vegetais renováveis para micro-organismos: Novas tendências em surfactantes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 641-646, 2004.
- DEON, M. C.; ROSSI, A.; DAL'MAGRO, C.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M.; Bioremediation of contaminated soil with oils residuals through bioaugmentation and natural attenuation, **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, p. 73-82, 2012.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- DESAI, J. D.; DESAI, A J. Production of biosurfactants. In: **Biosurfactants: production, properties, applications**. Ed. Nain Kosaric: New York, 1993. cap. 2.

EL-SHESHTAWY, H. S.; DOHEIM, M. M. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 23, p. 1–6, 2014.

FRANÇA, I. W. L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ICA56 para biorremediação de solo impactado. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10–15, 2015.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, M. P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, p. 27–31, 2010.

GARBINO, C. F. **Caracterização e identificação de microrganismos produtores de biossurfactantes para a biorremediação de cátions metálicos**. Dissertação (Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais) – Centro Universitário La Salle, Canoas, 2013.

GUIMARÃES, A. K. V. **Extração do óleo e caracterização dos resíduos da borra de petróleo para fins de reuso**. Dissertação (Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

JHUH, C.; MASON, S. G. Rigorous theory of ring tensiometry. **Colloid and Polymer Science**, v. 253, p. 566–580, 1975.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260–265, 2005.

KHAN, A. W.; RAHMAN, M. S.; ZOHORA, U. S.; OKANAMI, M.; ANO, T. Production of surfactin using pentose carbohydrate by *Bacillus subtilis*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, p. 63–65, 2011.

KREPSKY, N. **Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

KURIAKOSE, A. P.; MANJOORAN, S. K. B. Bitumenous paints from refinery sludge. **Surface and Coatings Technology**, v. 145, p. 132–138, 2001.

LEITÃO, R. C.; VIANA, M. B.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, A. V.; SANTAELLA, S. T. Produção de biogás a partir do glicerol oriundo do biodiesel. **Comunicado Técnico 180 – EMBRAPA**, v. 1, p. 1–4, 2011.

LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo diesel comercial por *Saccharomyces Lipolytica***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R.; ADELZADEHA, M. R.; NOGHABI, K. A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa*

MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 183–193, 2009.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 67–72, 2012.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. A. T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413 – 418, 2015.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202–209, 2013.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new Biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in Oil Recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 785–793, 2009.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.

MARTI, M. E.; COLONNA, W. J.; PATRA, P. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 31–39, 2014.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JOHSSIM, L.J. Produção de etanol por hidrólise enzimática de bagaço de cana utilizando xilose recombinante por *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 274–282, 2002.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; BERTONI, T. E.; COSTA, J. A. V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 61, p. 721–726, 2006.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, p. 1942–1947, 2008.

MASSI, J. B.; REZENDE, M. I. Crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b por fermentação em estado sólido (FES) para a produção de biossurfactantes. **Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, p. 38–41, 2013.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C.J.; BELLON-FONTAINE, M. N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 822-832, 2001.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

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

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772–776, 2002.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 619-622, 2013.

OLIVEIRA, A. A. F.; ROCHA, N. S.; LOPES, C. A. M.; SÁ, M. E. P. Isolamento de *Corynebacterium aquaticum* em leite bubalino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 259-261, 2005.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir de biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 119-134, 1993.

PACHECO, G. J. **Produção de biosurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PEREIRA, R. C. **Ensilagem e fenação do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da produção de cachaça**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PINTO, M. H. **Produção de biosurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biosurfactantes bacterianos, **Química Nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

RAKESHKUMAR, M. J.; KALPANA, M.; NIDHI, J.; AVINASH, M.; BHAVANATH, J. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in

bioremediation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 52–58, 2013.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. v.3, Pelotas/RS, Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2000.

RUFINO, R. D.; DE LUNA, J. M.; DE CAMPOS TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34–38, 2014.

SÁ, T. N. M. **Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SANTOS, A. F. **Novas Perspectivas da Glicerina – Síntese de Novos Nitratos com Propriedades Farmacológicas e Melhoradores de Cetano**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

SANTOS, F. P. B. **Produção de biosurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a partir de glicerol**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D. Application of a biosurfactant produced in low-cost substrates in the removal of hydrophobic contaminants. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 295–300, 2015.

SILVA, G. G. H.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 519-526, 2002.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174–183, 2010.

SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; GRACEROSSEPAT, R.; SRISAKTHI, K.; GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 174–181, 2011.

SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; DE ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1848–1855, 2012.

SOBRINHO, H. B. D. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biosurfactante por *Candida sphaerica***. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SOUZA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; CRUZ, J. G. C. Cinética e caracterização de rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37, p. 431–441, 2014.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; OLIVEIRA, R. P. S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 89, p. 88–94, 2014.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261–265, 2006.

TOME, A. S. A. **Avaliação das propriedades gelificantes e emulsionantes de misturas de proteínas de pescado e de proteínas vegetais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.

VAZ, D. A.; GUDIÑA, E. J.; ALAMEDA, E. J.; 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.

VIDOTTI, R. M. Tecnologias para o aproveitamento integral de peixes. **Curso: Técnica de manejo em piscicultura intensiva**, São Paulo, 2011.

VILELA, W. F. D. **Seleção, caracterização e aplicação de novos biossurfactantes produzidos por bactérias marinhas a partir de substratos de baixo custo**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

VILELA, W. F. D.; FONSECA, S. G.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; NITSCHKE, M. Production and properties of a surface-active lipopeptide produced by a new marine *Brevibacterium luteolum* Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 2245–2256, 2014.

YAN, P.; LU, M.; YANG, Q. Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 24–28, 2012.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1329–1334, 2005.

ZOUARI, R.; BESBES, S.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Cookies from composite wheat-sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. **Food Chemistry**, v. 194, p. 758–769, 2015.

ZILIO, R. L. **Biorremediação de solos contaminados a partir de biossurfactante obtidos de resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

ZÍLIO, R.; HOLZ, J.; GOULART, P.; RADMNN, E. M.; TREICHEL, H.; COSTA, J. A. V. Biorremediação de solo arenoso contaminado por derrame simulado com benzeno, tolueno e xileno. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 39–47, 2013.

ANEXO 1

Figura 24 – Curva padrão do corante vermelho 40