



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ANNE KAMILLY NOGUEIRA FELIX**

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA APLICABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE  
PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* LAMI005 A PARTIR DO SUCO DE CAJU**

**FORTALEZA  
2012**

ANNE KAMILLY NOGUEIRA FELIX

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA APLICABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE  
PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* LAMI005 A PARTIR DO SUCO DE CAJU

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profª. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Coorientadora: Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA  
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F36c

Felix, Anne Kamilly Nogueira.

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA APLICABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO  
POR *Bacillus subtilis* LAMI005 A PARTIR DO SUCO DE CAJU / Anne Kamilly Nogueira Felix. – 2012.  
101 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

Orientação: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar .

Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. surfactina. 2. *Anacardium occidentale*. 3. bioensaio. I. Título.

CDD 660

---

ANNE KAMILLY NOGUEIRA FELIX

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA APLICABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE  
PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* LAMI005 A PARTIR DO SUCO DE CAJU

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em 30 / 07 / 2012.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra de Aguiar Soares  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*À minha família, base de tudo na minha vida. Meus pais, Wilson e Idelzuite, minhas irmãs, Ludmila e Karollyne, meu noivo Marcelo e minha madrinha Alzenir.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente a Deus, pois em nenhum momento da minha vida Ele me desamparou.

A Nossa Senhora Aparecida e Santo Expedito, dos quais sou devota, agradeço pela vida, saúde e por me atender prontamente em momentos difíceis e me proporcionar momentos inesquecíveis.

Agradeço aos meus pais pelo exemplo, incentivo, apoio e carinho. Meu paizão Wilson, exemplo de homem, pai, alegria e companheirismo, por diariamente me proporcionar manhãs maravilhosas me fortalecendo para a luta do dia-dia. Minha mamãe Idelzuite, exemplo de mulher guerreira, mãe, profissional e zelo, por sempre cuidar de mim com tanto carinho e me apoiar em todas as decisões.

As minhas irmãs, meu orgulho, meninas batalhadoras, estudiosas, lindas e muito especiais. Karollyne, minha gordinha linda que amo incondicionalmente, por ser minha confidente e sempre me apoiar em tudo na minha vida. Ludmila, por ser o alicerce de toda a nossa família e sempre ter a palavra certa na hora certa.

A minha madrinha Alzenir, minha segunda mãe, por proporcionar momentos inigualáveis em minha vida, principalmente em minha infância, pessoa com a qual, mesmo distante, sempre posso contar.

Ao meu noivo Marcelo, pelo amor, companheirismo, paciência ao entender minha ausência em muitos momentos e, ao mesmo tempo, por ser uma pessoa tão presente.

Aos meus amigos Júnior, Carolina Freire e Fernanda por uma amizade tão especial e cúmplice.

A professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, meus sinceros agradecimentos, por sempre acreditar em meu potencial.

A professora Dra. Rívia Saraiva de Santiago Aguiar, por acreditar em mim ao me aceitar como sua orientanda.

A professora Dra. Maria Valderez Ponte Rocha, pelas correções na dissertação e, principalmente, por estar sempre à disposição de todos no grupo GPBio do qual fazemos parte.

A enorme galerinha do GPBio: Álvaro, Bete, Cleiton, Cristiane, Darlane, Diana, Edvan, Emanuel, Iuri, Ítalo, Jéssica, Juliana, Kênia, Leonardo, Ticiane e Tigressa, obrigada pelo companheirismo de todos, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração. Em especial a minhas amigas Camilla, Jéssica, Juliana, Kênia, Marylane e Ticiane por essa amizade tão especial, presente em momentos bons e ruins.

A todos do GPTA: Ana Alice, Daniel, Filipe, Marcinha, Regiane e todos os outros que fazem parte desse grupo que me recebeu de braços abertos.

Ao Gustavo, um amigo que me ajudou muito no desenvolvimento desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Larissa e Gaby, pessoas muito queridas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

*“A amizade desenvolve a felicidade e  
reduz o sofrimento, duplicando a nossa  
alegria e dividindo a nossa dor.”*

*(Joseph Addison)*

## RESUMO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, que possuem em sua estrutura química segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, espacialmente separados que auxiliam na formação de emulsões e disponibilizam compostos à célula microbiana. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão. Muitos tipos de surfactantes quimicamente sintetizados são hoje utilizados, embora o desenvolvimento de produtos alternativos, biodegradáveis e menos tóxicos, como os chamados bio surfactantes, agentes obtidos por via microbiológica, seja uma estratégia importante na obtenção de componentes mais compatíveis com o meio ambiente e na ampliação das propriedades específicas e aplicações desses compostos. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo, caracterizar o bio surfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju como fonte de carbono, ao realizar estudos de conformação e estrutura dos compostos, determinando assim os grupos funcionais pertencentes à molécula; estudar os efeitos toxicológicos da surfactina produzida, visando um maior entendimento sobre a toxicidade do bio surfactante em organismos vegetais e animais; avaliar a manutenção das características tensoativas da surfactina ao ser submetida a diferentes condições ambientais, além de estudar a estabilidade das emulsões formadas com o bio surfactante que foi produzido em suco de caju clarificado, agregando-se valor ao processo, uma vez que a fonte utilizada é disponível e de baixo custo. Os espectros obtidos indicaram a similaridade entre a surfactina produzida neste trabalho e a surfactina padrão (Sigma). O lipopeptídeo produzido apresentou atividade superficial altamente estável, com uma CMC igual a 12,5 mg.L<sup>-1</sup> e sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água para 31,8 mN.m<sup>-1</sup> e a tensão interfacial do n-hexadecano para 2 mN.m<sup>-1</sup>. A habilidade de emulsificação a altas temperaturas, pHs ácidos e básicos e diferentes concentrações de NaCl também foi demonstrada. Os diagramas de fase mostraram a possibilidade de aplicação do bio surfactante na biorremediação, no tratamento de resíduos e em fluidos de corte. O bio surfactante também apresentou atóxico quando analisado frente à *Artemia salina* com CL<sub>50</sub> igual 612,27 µg.mL<sup>-1</sup> e frente *Lactuca sativa*, no qual apresentou índice de germinação superior a 80% em concentrações elevadas, evidenciando seu potencial para aplicações na indústria de cosméticos, alimentos e fármacos. O bio surfactante produzido também se mostrou eficiente ao remover, aproximadamente, 82% do diesel e 77% do petróleo adsorvidos em areia.

**Palavras-chave:** surfactina, *Anacardium occidentale*, bioensaio

## ABSTRACT

The surfactants are amphipathic molecules which have in their chemical structure hydrophobic and hydrophilic segments, spatially separated to assist in the formation of emulsions available compounds and the microbial cell. Due to these characteristics, the emulsifiers decrease the surface tension at the interface of immiscible phases, allowing thus that they mix to form the emulsion. Many types of chemically synthesized surfactants are used today, although the development of alternative products, less toxic and biodegradable, as so-called biosurfactants obtained by microbiological agents, is an important strategy in obtaining components more compatible with the environment and expanding specific properties and applications of these compounds. In this context, this study aims to characterize the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 using cashew apple juice as carbon source, to conduct studies of the structure and conformation of the compounds, thereby determining the functional groups belonging to the molecule, to study the toxicological effects of surfactin produced, designed to further understanding of the toxicity of the biosurfactant in vegetable and animal organisms; evaluate the maintenance of the characteristics of surfactants surfactin to be subjected to different environmental conditions, in addition to studying the stability of emulsions formed with biosurfactant which was produced in clarified cashew juice, adding value to the process, since the source used is available and inexpensive. The spectra obtained indicated the similarity between this work produced surfactin and surfactin standard (Sigma). The lipopeptide surface produced had a highly stable activity, with a CMC 12.5 mg.l<sup>-1</sup> and capable of reducing the surface tension of water to 31.8 mN.m<sup>-1</sup> and interfacial tension of n-hexadecane to 2 mN.m<sup>-1</sup>. The ability of emulsifying at high temperatures, acidic and basic pH and different concentrations of NaCl was also demonstrated. The phase diagrams shown the possibility of application of the biosurfactant in the bioremediation of waste treatment and cutting fluids. The biosurfactant also showed non-toxic when analyzed in the brine shrimp with LC<sub>50</sub> equal to 612.27 µg.mL<sup>-1</sup> forward and *Lactuca sativa*, presented at which germination index higher than 80% high concentrations, demonstrating its potential for applications in the cosmetics industry , food and drugs. The biosurfactant produced also efficient in removing, approximately, 82% diesel and 77% petroleum adsorbed on sand.

**Keywords:** surfactin, *Anacardium occidentale*, bioassay

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Organização das moléculas na (1) tensão superficial e (2) interfacial (Barreto, 2011).	24
<b>Figura 2 –</b>	Relação da tensão superficial com a concentração de surfactante no sistema. Em destaque a CMC, momento em que as micelas começam a ser formadas (Barreto, 2011).	25
<b>Figura 3 –</b>	Estrutura química da molécula de surfactina (Nitschke e Pastore, 2002).	28
<b>Figura 4 –</b>	Coluna cromatográfica de fase reversa utilizada para a purificação do bio surfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 utilizando suco de caju.	34
<b>Figura 5 –</b>	Esquema de distribuição das sementes para a realização do teste de toxicidade aguda por meio do índice de germinação e alongamento das raízes de alface <i>Lactuca sativa</i> .	40
<b>Figura 6 –</b>	Espectro de infravermelho da fração F:29-35 (bio surfactante purificado).	44
<b>Figura 7 –</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da fração F:29-35 (300 MHz, piridina-d5).	46
<b>Figura 8 –</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da fração F:29-35 (75 MHz, piridina-d5).	48
<b>Figura 9 –</b>	Espectro de massa de alta resolução. (1) fração 29-35; (2) surfactina padrão (Sigma).	49
<b>Figura 10 –</b>	Estruturas de [Ile]Surfactina (1) e [Leu]Surfactina (2). (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1994).	50
<b>Figura 11 –</b>	Concentração Micelar Crítica (CMC) da surfactina produzida por <i>B. subtilis</i> LAMI005 a partir do suco de caju clarificado. Barras de erro representam o desvio padrão.	51
<b>Figura 12 –</b>	Índice de Emulsificação (IE <sub>24</sub> ) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com bio surfactante de <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão.	53
<b>Figura 13 –</b>	Estabilidade da emulsão, até 96 horas, com diferentes hidrocarbonetos. (■) gasolina, (●) diesel, (▲) querosene, (▼) n-hexadecano, (◀) tolueno e (▶) heptano. Barras de erro representam o desvio padrão.	54
<b>Figura 14 –</b>	Efeito da variação do pH no Índice de Emulsificação de emulsão	55

formada com diesel (■) e na atividade superficial (■) do bioassurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão.

- Figura 15 –** Efeito da variação da força iônica no Índice de Emulsificação de emulsão formada com diesel (■) e na atividade superficial (■) do bioassurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão. 57
- Figura 16 –** Efeito da variação da temperatura no Índice de Emulsificação de emulsão formada com diesel (■) e na atividade superficial (■) do bioassurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão. 59
- Figura 17 –** Ilustração da obtenção de dados para a construção dos diagramas de fases, com composições de 20 a 90% (v/v) de solução de bioassurfactante. a. Condição inicial (surfactina – querosene); b. Condição inicial (surfactina – diesel); c. Condição final após ser submetido a 90°C (surfactina – querosene); d. Condição final após ser submetido a 90°C (surfactina – diesel). 61
- Figura 18 –** Diagramas de fases para o sistema de composição A/O em função da temperatura. (1) Querosene; (2) Diesel. E - fase emulsionada; A – fase aquosa; O - fase óleo. 62
- Figura 19 –** Índice de Germinação (■) e crescimento das raízes (■) da espécie *Lactuca sativa* em diferentes concentrações do bioassurfactante produzido por LAMI005 em suco de caju. Barras de erro representam o desvio padrão. 64
- Figura 20 –** Taxa de mortalidade da espécie *Artemia salina* em diferentes concentrações do bioassurfactante produzido por LAMI005. 65

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1 –** Remoção de hidrocarbonetos de areia contaminada.

67

## LISTA DE SÍMBOLOS

IE <sub>24</sub>	Índice de emulsificação
H <sub>FE</sub>	Altura da fase emulsionada
H <sub>TOTAL</sub>	Altura total da solução
%GS	Porcentagem de germinação de sementes
%GE	Porcentagem de germinação no extrato
%GC	Porcentagem de germinação no controle
%CR	Porcentagem de crescimento da raiz
MCE	Crescimento no extrato (média)
MCC	Crescimento no controle (média)
CL <sub>50</sub>	Concentração letal para 50% da população
ppm	Partes por milhão
δ <sub>H</sub>	Deslocamento químico em ressonância magnética nuclear de hidrogênio
δ <sub>C</sub>	Deslocamento químico em ressonância magnética nuclear de carbono
A	Fase aquosa
O	Fase óleo
E	Fase emulsionada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Surfactantes e biossurfactantes.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Classificação dos biossurfactantes.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Aplicação dos biossurfactantes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Biorremediação.....</i></b>	<b>22</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Recuperação melhorada do petróleo.....</i></b>	<b>22</b>
<b>2.3.3</b>	<b><i>Indústrias de alimentos e cosméticos.....</i></b>	<b>23</b>
<b>2.3.4</b>	<b><i>Aplicações terapêuticas.....</i></b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Propriedades funcionais dos biossurfactantes.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>A utilização de substratos alternativos na produção de biossurfactantes..</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Surfactina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Recuperação e elucidação estrutural da surfactina.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Produção do biossurfactante.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.1</b>	<b><i>Substrato e meios de cultura.....</i></b>	<b>32</b>
<b>3.1.2</b>	<b><i>Produção do biossurfactante.....</i></b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Extração e purificação do biossurfactante.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Extração líquido-líquido.....</i></b>	<b>33</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Cromatografia em coluna de fase reversa C18.....</i></b>	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise estrutural do biossurfactante.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....</i></b>	<b>35</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i></b>	<b>35</b>
<b>3.3.3</b>	<b><i>Espectrometria de Massa de Alta Resolução.....</i></b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Caracterização físico-química do biossurfactante.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.1</b>	<b><i>Tensão superficial e determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....</i></b>	<b>36</b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Índice de Emulsificação e estabilidade da emulsão.....</i></b>	<b>37</b>
<b>3.4.3</b>	<b><i>Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeito do pH, da salinidade e da temperatura).....</i></b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Diagrama de fases.....</b>	<b>38</b>

<b>3.6</b>	<b>Testes de toxicidade.....</b>	<b>38</b>
<i>3.6.1</i>	<i>Teste de germinação com Lactuca sativa.....</i>	39
<i>3.6.1.1</i>	<i>Procedimento de teste.....</i>	39
<b>3.6.2</b>	<b>Bioensaio toxicológico frente às larvas de Artemia salina .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7</b>	<b>Aplicação do biossurfactante na remoção de hidrocarbonetos contaminantes de areia.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização estrutural do biossurfactante purificado.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Tensão superficial e determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito do pH, da força iônica e da temperatura na atividade do biossurfactante.....</b>	<b>55</b>
<i>4.4.1</i>	<i>Efeito do pH.....</i>	55
<i>4.4.2</i>	<i>Efeito da força iônica.....</i>	57
<i>4.4.3</i>	<i>Efeito da temperatura.....</i>	58
<b>4.5</b>	<b>Diagramas de fases.....</b>	<b>60</b>
<b>4.6</b>	<b>Bioensaios toxicológicos.....</b>	<b>63</b>
<i>4.6.1</i>	<i>Teste de germinação com Lactuca sativa.....</i>	63
<i>4.6.2</i>	<i>Teste de mortalidade do microcrustáceo da espécie Artemia salina.....</i>	64
<b>4.7</b>	<b>Aplicação do biossurfactante na remoção de hidrocarbonetos contaminantes de areia.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXO C.....</b>	<b>95</b>
	<b>ANEXO D.....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO E.....</b>	<b>99</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

Os surfactantes são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema substituindo parte das moléculas, na interface, com alta energia, o que diminui a tensão superficial e interfacial dos líquidos (BUENO, 2010). São moléculas anfipáticas com frações hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam nas interfaces óleo/água ou ar/água, fases que possuem pontes de hidrogênio e diferentes graus de polaridade (FRACCHIA *et al.*, 2012; BANAT, 2010). A porção apolar é uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (DESAI e BANAT, 1997). Todas essas características inerentes aos surfactantes os permitem formar microemulsões, onde os hidrocarbonetos se solubilizam em água ou a água se solubiliza em hidrocarbonetos (RON e ROSENBERG, 2001).

Uma propriedade fundamental dos surfactantes é sua capacidade de formar micelas (agregados) que são compostos formados a baixas concentrações em água, com estabilidade termodinâmica e facilmente reprodutíveis (MRESTANI *et al.*, 2000). A concentração mínima para iniciar a formação desses agregados (micelas) chama-se Concentração Micelar Crítica (CMC) e, é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante, podendo também ser definida, como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa (RUFINO, 2006; BARROS *et al.*, 2007). As características básicas que determinam um bom surfactante são a eficiência, medida através da CMC, e a efetividade, que está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais, essas dois atributos habilitam os surfactantes para aplicações em setores industriais que exijam processos de: lubrificação, capacidade espumante, detergência, capacidade molhante, emulsificação, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BARROS *et al.*, 2007).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente hoje em dia são quimicamente sintetizados a partir do petróleo (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Dado que os surfactantes químicos são derivados de produtos petrolíferos, caros e, potencialmente, uma ameaça ambiental, devido sua natureza recalcitrante, torna-se evidente a necessidade da busca por biosurfactantes como alternativa para substituição aos existentes (BARROS *et al.*, 2008).

Biosurfactantes são moléculas com atividade superficial, recuperados dos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras, sintetizados a partir de diversos substratos como

açúcares, óleos, alcanos e resíduos agroindustriais (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004; NITSCHKE E PASTORE, 2002; MESQUITA, 2004).

O que torna os biossurfactantes comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos quanto à sua eficiência, é a possibilidade de sua produção a partir de substratos renováveis utilizando diferentes espécies microbianas, com inúmeras combinações, o que resulta em compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, específicas e seletivas (REISER *et al.*, 1989). A superioridade dos biossurfactantes é enaltecida nas vantagens que estes exercem sobre os seus análogos químicos: menor toxicidade, maior biodegradabilidade, biocompatibilidade, elevada estabilidade em extremos de temperatura, pH e salinidade (CANET *et al.*, 2002; APARNA *et al.*, 2012; MEDEIROS, 2007). Contudo, sua produção apresenta problemas como o alto custo dos substratos aliado aos métodos ineficientes de recuperação (NITSCHKE E PASTORE, 2006). Assim, para aumentar a utilização industrial de biossurfactantes, o custo de produção deve ser equiparado ao dos surfactantes sintéticos e, com inúmeras possibilidades de rejeito orgânico disponíveis no Brasil, uma possível estratégia para alcançar este objetivo é o uso dessas matérias primas como alternativa, um exemplo é o caju, um produto com 80% de seu total desperdiçado (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi estudar a aplicabilidade do biossurfactante em biorremediação de solo contaminado, avaliar seu efeito toxicológico a partir da realização de testes sobre sementes de alface *Lactuca sativa* e sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. O biossurfactante produzido também foi analisado por metodologias qualitativas e quantitativas, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (RMN) nas frequências do <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, espectroscopia na região do infravermelho (IV), tensão superficial e CMC, estabilidade em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade e avaliação na formação de emulsões através da construção de diagramas de fases.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Surfactantes e bio surfactantes

Os surfactantes são agentes superficiais ativos que diminuem a tensão superficial e interfacial dos líquidos, reduzindo a energia livre do sistema ao substituir as moléculas de alta energia na interface (BUENO, 2010). São moléculas anfipáticas com frações hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam na interface entre fases fluidas (óleo/água ou ar/água) com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio (BANAT, 2010; FRACCHIA *et al.*, 2012). A porção apolar é formada por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas, grupos aromáticos ou policíclicos (LIMA, 2007), e a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (DESAI e BANAT, 1997). Essas características inerentes aos surfactantes os permitem formar microemulsões, onde os hidrocarbonetos se solubilizam em água ou a água se solubiliza em hidrocarbonetos (RON e ROSENBERG, 2001). Outra propriedade fundamental dos surfactantes é sua capacidade em formar micelas, onde a concentração mínima na qual se inicia a formação destas é chamada Concentração Micelar Crítica(CMC) (BARROS *et al.*, 2007).

Os surfactantes que existem atualmente são quimicamente sintetizados a partir do petróleo, não degradáveis e seu processo de produção e geração de subprodutos podem ser ambientalmente danosos, podendo causar toxicidade (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002), com isso, a demanda por produtos surfactantes obtidos biotecnologicamente, vem crescendo e, isso se deve ao fato de este ser compatível ambientalmente, apresentar elevada eficácia, o que interfere diretamente nos dividendos de indústrias que utilizam essas biomoléculas (AL-BAHRY *et al.*, 2012).

O nome bio surfactante é dado a um grupo estruturalmente variado, de metabólicos de origem microbiana com diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície, propriedades essas comuns aos surfactantes sintéticos (BOSCH, 1988; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

Ao final da produção, os bio surfactantes podem ficar retidos na parede celular ou serem liberados para o meio, ao permanecerem na superfície celular microbiana, essas

biomoléculas auxiliam no transporte de substratos insolúveis através da membrana (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Quando segregados, emulsionam e solubilizam hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, favorecendo o crescimento e desenvolvimento desses micro-organismos em substratos de natureza apolar, além de influenciarem na adesão e liberação da célula a superfícies (NITSCHKE e PASTORE, 2002; MANEERAT e PHETRONG, 2007; VIRAMONTES-RAMOS *et al.*, 2010).

Pesquisas com bio surfactantes vêm se intensificando nas últimas décadas, devido às diversas vantagens oferecidas por eles quando comparados aos homólogos sintéticos, como: menor tensão superficial a menores concentrações; maior estabilidade frente às condições extremas de temperatura, pH e salinidade; alta biodegradabilidade na água e no solo; especificidade devido sua grande diversidade química; baixa toxicidade; síntese a partir de fontes de carbono renováveis; possibilidade de modificação de sua estrutura química e suas propriedades físicas por meio de manipulações genéticas, biológicas ou químicas (COOPER e PADDOCK, 1984; MULLIGAN e GIBBS, 1989; BANAT, 1993; DESAI e BANAT, 1997; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; BOGNOLI, 1999; MAKKAR e CAMEOTRA 1999; SCHIPPERS *et al.*, 2000; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; EDWARDS *et al.*, 2003; MAKKAR e ROCKNE, 2003; DAS e MUKHERJEE, 2005; ILORI *et al.*, 2005; MANEERAT, 2005; SEPAHY *et al.*, 2005; MUKHERJEE *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2007).

Não obstante, o uso de bio surfactantes em larga escala ainda encontra-se em fase inicial, devido seu alto custo de produção, de substratos caros, métodos imperitos de recuperação dos produtos e baixo rendimento de produção (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

## 2.2 Classificação dos bio surfactantes

Os bio surfactantes são classificados de acordo com sua composição e o micro-organismo de origem, já os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Nas principais classes estão os glicolipídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos, lipopeptídeos e lipoproteínas, surfactantes particulados e surfactantes poliméricos (DESAI e BANAT, 1997; NITSCHKE e PASTORE,

2002).

No grupo dos biossurfactantes de baixo peso molecular, considerados os mais efetivos na redução da tensão superficial, estão os glicolipídeos e os lipopeptídeos (LIN, 1996). Já no grupo dos biossurfactantes de alto peso molecular, que atuam como dispersantes, estão os polissacarídeos, as proteínas, os lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de mistura desses biopolímeros (RON e ROSENBERG, 2002).

### Glicolipídeos

Os glicolipídeos são moléculas de carboidratos - glicose, manose, galactose ou ramnose - combinados com ácidos alifáticos de cadeias longas, entre muitos, os mais conhecidos são os soforolipídeos, ramnolipídeos e os trealolipídeos (HOLMBERG, 2001; LIMA, 2008).

Os soforolipídeos, produzidos por leveduras da espécie *Candida*, apresentam um carboidrato dimérico (soforose) ligado glicosidicamente ao grupo hidroxil do penúltimo carbono do ácido graxo de cadeia longa (C16-C18) (LIMA, 2008). Têm suas propriedades tensoativas mantidas em condições extremas de pH, NaCl e temperatura, apresentando grande potencial como agente terapêutico (COOPER e PADDOCK, 1984; LIMA, 2008).

Os ramnolipídeos são biosurfactantes produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, possuem em sua estrutura ramnose ligada à ácido β-hidroxidecanóico, onde sete de seus homólogos já tiveram sua estrutura determinada (ABALOS *et al.*, 2001; LIMA, 2008).

Os trealolipídeos são surfactantes que apresentam tamanho e estrutura determinados pelo organismo de origem - *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium* – nestes a molécula de trealose está ligada ao ácido micólico (ASSELINÉAU e ASSELINÉAU, 1978; GAUTAM e TAYAGI, 2006).

### Fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros

Ao utilizar alcanos como fonte de carbono e de energia, as bactérias e leveduras aplicadas em um processo de produção, sintetizam grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídeos surfactantes (CIRIGLIANO e GARMAN, 1984). O comprimento da cadeia hidrocarbonada nas estruturas desses bio surfactantes é diretamente relacionado ao seu balanço hidrófilo-lipófilo (HLB) (LIMA, 2008).

Os lipídeos neutros englobam os ácidos graxos, triacilgliceróis e ácidos micólicos, onde a maioria apresenta algum grau de atividade tensoativa (COOPER e ZAJIC, 1980; LIMA, 2008).

### Lipopeptídeos e lipoproteínas

Lipopeptídeos e lipoproteínas são os chamados surfactantes lipoprotéicos, apesentam potencial atividade antimicrobiana (LIMA, 2008) e possuem estrutura cíclica (VATER *et al.*, 2002), os mais relatados são, micosubtilisina (PEYPOUX *et al.*, 1976), bacilomicina (PEYPOUX *et al.*, 1984) e surfactina, iturina, fengicina, liquenisina (VATER *et al.*, 2002). A surfactina possui um ácido graxo  $\beta$ -hidroxi e a iturina, por sua vez apresenta um ácido graxo  $\beta$ -amino, como componente lipofílico, e por isso são chamados de são ciclolipoheptapeptídeos (LIMA, 2008).

### Surfactantes particulados

Entende-se por bio surfactantes particulados, as células microbianas e vesículas extracelulares com atividades tensoativas e elevada hidrofobicidade superficial, como por exemplo, algumas espécies de cianobactérias e patógenos – *S. aureus* e *Serratia sp.* (LIMA, 2008). As bactérias do gênero *Acinetobacter sp.*, quando crescem em meio com hexadecano, produzem vesículas extracelulares com elevada atividade surfactante que captam alcanos para a célula (GAUTAM e TAYAGI, 1979).

Embora as funções ainda não tenham sido totalmente elucidadas, grande número de

micro-organismos tem se mostrado capaz de produzir compostos com variada atividade superficial (LIMA, 2008).

### Surfactantes poliméricos

Lipopolissacarídeos ou biosurfactantes poliméricos são polissacarídeos ligados covalentemente a ácidos graxos, e os mais conhecidos são o liposan, o emulsan e a manoproteína (LIMA, 2008).

Liposan é um emulsificante produzido de forma extracelular a partir da *C. lipolytica*, composto, aproximadamente, de 83% de carboidrato e 17% de proteínas, suas propriedades emulsificantes e estabilizantes se equiparam à surfactantes comerciais (CIRIGLIANO e GARMAN, 1985).

Emulsan, o primeiro surfactante microbiano a ser produzido e comercializado em larga escala, é um bioemulsificante extracelular, caracterizado como um heteropolissacarídeo polianiónico e considerado um dos emulsificantes mais efetivos (FERRAREZZO, 1998; ROSENBERG e RON, 1999).

A manoproteína é sintetizada pela *S. cerevisiae*, em um processo biotecnológico simples, de larga escala e de baixo custo, com excelente atividade emulsificante frente a diferentes óleos, alcanos e solventes orgânicos e estável em uma larga faixa de pH (CAMERON *et al.*, 1988; BARROS *et al.*, 2007).

## **2.3 Aplicação dos biosurfactantes**

Os biosurfactantes são compostos que possuem ampla diversidade química com propriedades para aplicações específicas, sua aplicação comercial é determinada por seu custo de produção e suas propriedades em relação aos surfactantes sintéticos, no entanto, sua utilização industrial em larga escala ainda não é competitiva devido aos altos custos de produção (DESAI e BANAT, 1997; NITSCHKE e PASTORE, 2002; RODRIGUES *et al.*,

2006; FARIA, 2010). No entanto, em um futuro próximo, os bio surfactantes poderão se tornar compostos de aplicação comum nas indústrias, devido sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e versatilidade (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os bio surfactantes são moléculas com aplicabilidade em diferentes setores, entre os quais podemos citar a biorremediação, recuperação melhorada do petróleo, indústria de cosméticos e alimentos, aplicações terapêuticas e nanotecnologia (FARIA, 2010).

### **2.3.1 Biorremediação**

Na remediação de água e solo contaminados por compostos hidrofóbicos, a atuação dos bio surfactantes consiste em emulsificar misturas de hidrocarbonetos, auxiliando na biodegradação de contaminantes orgânicos em água e solo (LIN, 1996; FARIA, 2010). De acordo com ZHANG e MAIER, 1992, duas explicações dão amparo científico para esse tipo de biodegradação: (i) maior acessibilidade dos compostos hidrofóbicos à célula devido o aumento da solubilidade; (ii) aumento da hidrofobicidade através da interação dos surfactantes com a superfície celular.

### **2.3.2 Recuperação melhorada do petróleo**

A utilização de micro-organismo e seus metabólitos na recuperação de petróleo são aplicados no resgate do óleo residual que permanece nos reservatórios após os procedimentos de recuperação primária e secundária (BANAT, 1995; BANAT *et al.*, 2000; FARIA, 2010). Em cooperação à essa tecnologia tem-se os bio surfactantes, que atuam na redução da tensão interfacial e das forças capilares entre óleo/rocha, permitindo a retirada do óleo presente nos poros da rocha, pois sofrem emulsificação (BANAT *et al.*, 2000; NITSCHKE e PASTORE, 2002; FARIA, 2010).

No entanto, para a aplicação dos bio surfactantes na MEOR- Microbial Enhanced Oil Recovery, três técnicas podem ser aplicadas de forma isolada ou

associadas, são elas: (i) adição dos biossurfactantes nos reservatórios; (ii) adição de micro-organismo nos reservatórios, para que a produção do biosurfactante ocorra na interface óleo-água; (iii) estimulação dos micro-organismo nativos para a produção de biossurfactantes através da inserção de nutrientes apropriados no próprio reservatório (BANAT, 1995).

### **2.3.3 Indústria de alimentos e cosméticos**

O aumento da exigência pelos consumidores, por produtos naturais e biodegradáveis no processamento de alimentos e cosméticos tem diminuído a demanda na procura por compostos sintéticos (SHEPHERD *et al.*, 1995; FARIA, 2010). Dentro dessas imposições, os biossurfactantes apresentam todos os requisitos.

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes podem atuar na formação da consistência e da textura, na dispersão de fases, na solubilização de aromas e na prevenção da formação de biofilmes (BANAT *et al.*, 2000; BANAT, 2000; NITSCHKE e PASTORE, 2002; FARIA, 2010).

Já na indústria farmacêutica e de higiene pessoal, os surfactantes biológicos podem atuar como umectantes por apresentarem boa compatibilidade com a pele e aceitabilidade ecológica (BROWN, 1991; BANAT *et al.*, 2000; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Outras características apresentadas pelos biossurfactantes como solubilização, detergência, dispersão, emulsificação e formação de espumas, possibilita sua utilização em uma infinidade setores industriais (BANAT *et al.*, 2000; FARIA, 2010).

### **2.3.4 Aplicações terapêuticas**

A atuação dos biossurfactantes como agentes terapêuticos e medicamentos sintéticos no combate à doenças fez com que seu uso comercial tenha aumentado nos últimos anos (ARIMA *et al.*, 1968; PEYPOUX *et al.*, 1999; NITSCHKE e PASTORE, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2006; FARIA, 2010). Sua atuação ocorre com a desestruturação de membranas a partir da emulsificação de lipídios, lipoproteínas e fosfolipídios (FARIA, 2010).

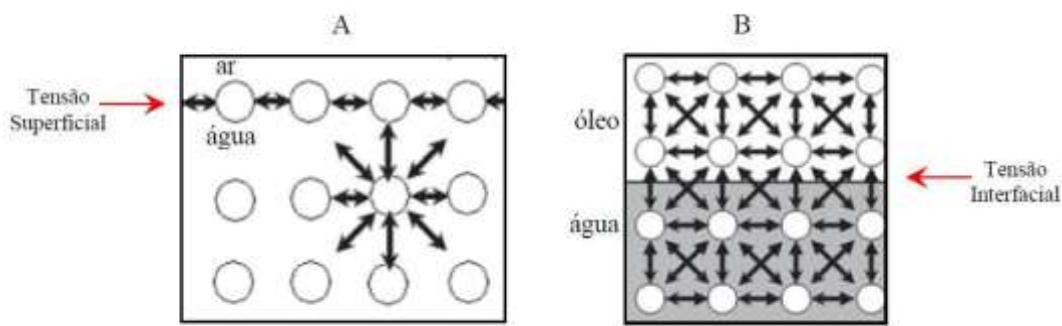
O interesse biotecnológico e farmacêutico pela surfactina tem crescido devido sua expressiva atividade de superfície e potencial antimicrobiano, além de ser relacionada a diversas propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e antiviral, sendo a última relacionada, principalmente, às interações físico-químicas entre o biosurfactante e a bicamada lipídica (DESAI e BANAT, 1997; KIM *et al.*, 1998; SEYDLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008; FARIA, 2010).

RODRIGUES *et al.* (2006) e FERNANDES *et al.* (2007) mostraram, respectivamente, a ação de surfactantes lipopeptídicos produzidos por *Bacillus* e da surfactina contra várias linhagens bacterianas.

## 2.4 Propriedades funcionais dos biosurfactantes

Os surfactantes substituem parte das moléculas de alta energia na interface, reduzindo a energia livre do sistema, que por sua vez diminui a tensão superficial e interfacial dos líquidos (BUENO, 2010). A tensão superficial acontece na interface ar/água (na superfície do sistema), onde forças coesivas se acumulam, já as forças coesivas entre moléculas de água da tensão interfacial se agrupam na interface óleo/água (no interior do sistema), conforme mostrado na Figura 1(BARRETO, 2011).

**Figura 1** – Organização das moléculas na (1) tensão superficial e (2) interfacial (Barreto, 2011).



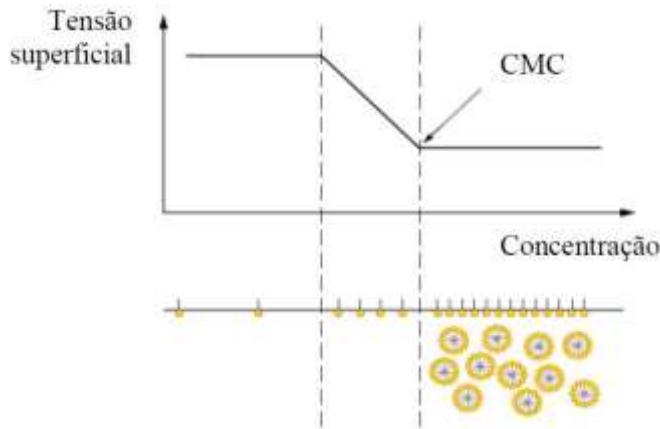
As tensões superficial e a interfacial sofrem redução quando na presença de agentes tensoativos, podendo diminuir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN.m<sup>-1</sup> e a

tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de 40 para 1 mN.m<sup>-1</sup> (MULLIGAN, 2005).

Os surfactantes também têm a capacidade de formar grandes agregados de dimensões coloidais, chamados micelas, compostos com estabilidade termodinâmica, de fácil reprodução e, formados a baixas concentrações em água, sendo essa concentração mínima para a formação de micelas, micelização, chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC) (PELIZZETI e PRAMAURO, 1985; MRESTANI *et al.*, 2000; MANIASSO, 2001).

A formação das micelas acontece em curtos intervalos de alteração na concentração do surfactante e isso pode ser detectado através das grandes alterações nas propriedades físico-químicas da solução (MANIASSO, 2001; RIZZATTI *et al.*, 2009). Acima da CMC, as moléculas do tensoativo formam micelas com 30-200 monômeros (Figura 2), em solução aquosa essas micelas apresentam caudas hidrofóbicas com orientação para o interior e grupos hidrofílicos ou carregados, orientados para o exterior (MANIASSO, 2001; MORAES e REZENDE, 2004; BARRETO, 2011). Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros (MORAES e REZENDE, 2004; CORRER *et al.*, 2007; BARRETO, 2011).

**Figura 2** – Relação da tensão superficial com a concentração de surfactante no sistema. Em destaque a CMC, momento em que as micelas começam a ser formadas (Barreto, 2011).



A CMC, também definida como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa, é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante (RUFINO, 2006). A caracterização de um bom surfactante se dá pela eficiência que é medida através da CMC e, pela efetividade que está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais do

sistema (BARROS *et al.*, 2007).

As micelas se particionam devido à presença das frações hidrofílicas e hidrofóbicas na composição dos bio surfactantes, a partição acontece nas interfaces óleo/água ou ar/água, que possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio (FRACCHIA *et al.*, 2012; BANAT, 2010). Essa diferença de polaridade - porção apolar composta de uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica - permite aos surfactantes a formação de microemulsões onde os hidrocarbonetos se solubilizam em água ou no agua nestes (DESAI e BANAT, 1997; RON e ROSENBERG, 2001).

## 2.5 A utilização de substratos alternativos na produção de bio surfactantes

A surfactina não é explorada comercialmente principalmente devido seu elevado custo de produção devido a utilização de substratos caros, processos ineficientes de recuperação e baixo rendimento (NITSCHKE e PASTORE, 2006; BARRETO, 2011), entretanto apresenta vantagens se comparada aos surfactantes existentes (sintéticos), especialmente no ramo econômico, ao considerar a absorção dos elevados valores de produção com a adição desse composto em formulações industriais de alto valor agregado (VELIKONJA e KOSARIC, 1993), o que sugere potencial aplicação industrial para esse lipopeptídeo (BARROS *et al.*, 2007).

Assim, visando o aumento do uso industrial de bio surfactantes, com um custo de produção competitivo quando comparado aos surfactantes sintéticos, a utilização de resíduos agroindustriais como matérias-primas alternativas para substrato na produção destes em escala industrial, é estrategicamente possível (BARROS *et al.*, 2007) e ambientalmente correto.

Com a produção industrial da surfactina ainda não especificada, aliada ao grande montante de resíduos agroindustriais gerados anualmente, a utilização desses rejeitos como substrato em processos biotecnológicos parece ser uma alternativa plausível (PANDEY *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2007).

BARROS *et al.* (2007) descreveram a importância da utilização de resíduos industriais como insumo em bioprocessos, segundo os autores, a utilização desses rejeitos na linha de produção de bio surfactantes, viabiliza a implantação desses processos em escala

industrial, no entanto, para a síntese desses compostos se faz necessário um balanço de nutrientes para desenvolver condições ideais de produção.

Dentro desse contexto, o suco de caju é um potencial substrato para a produção de surfactina, visto que em estudo realizado por OLIVEIRA *et al.* (2013), o *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio contendo suco de caju, foi capaz de produzir 220 mg.L<sup>-1</sup>.

O cajueiro é uma planta originária da região Nordeste do país, embora esteja presente em todo o território brasileiro. Para o agronegócio, o caju apresenta grande diversidade de derivados: da castanha, que é o fruto verdadeiro, obtém-se a amêndoia (ACC) e o líquido da casca (LCC), geralmente voltados para a exportação, constituindo o sustentáculo econômico do agronegócio caju; e do pedúnculo do caju (pseudofruto), fabrica-se bebidas, doces, que são, quase que em sua totalidade, consumidos em âmbito regional (EMBRAPA). Devido a grande desvalorização do pedúnculo, calcula-se que cerca de 80% do pedúnculo produzido é desperdiçado, assim vislumbra-se o aproveitamento deste co-produto na viabilização da utilização da surfactina (OLIVEIRA, 2010).

Diversos autores já estudaram muitos outros substratos alternativos na produção de biosurfactantes, como SOUSA *et al.* (2011) que estudaram a produção de rammolipídeos a partir de um co-produto do biodiesel, co-produto este também utilizado na produção de surfactina, em estudo desenvolvido por SOUSA, 2011.

## 2.6 Surfactina

A surfactina tem sido alvo de diversas pesquisas que exploram sua excepcional atividade surfactante, e é considerada o principal e mais efetivo surfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis* (BARROS *et al.*, 2007).

Esse lipopeptídeo, inicialmente descrito em 1968, por ARIMA, KAKINUMA e TAMURA, foi assim denominado devido seu caráter tensoativo muito evidente, mas sua exploração só se deu a partir de 1980, no entanto pesquisas sobre a molécula e seus micro-organismos produtores continuam bastante intensas até hoje (PEYPOUX *et al.*, 1999). A surfactina é capaz de reduzir a tensão superficial da água e interfacial do sistema água/n-

hexadecano de 72 para 27 mN.m<sup>-1</sup>, e de 43 para 1 mN.m<sup>-1</sup>, respectivamente (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

Apesar de o gênero *Bacillus* ser bastante visado em pesquisas relacionadas à produção de biossurfactantes, apenas 20 linhagens de *Bacillus* foram cadastradas como produtoras de surfactina (HSIEH *et al.*, 2004; BARRETO, 2011). A comercialização da surfactina padrão, para utilização em pesquisas é realizada a R\$ 88,00 o miligrama (SIGMA), esse alto valor comprova a urgência em buscar novas cepas produtoras e substratos alternativos, para aplicação e não, necessariamente, comercialização desse biosurfactante (BARRETO, 2011).

A surfactina (Figura 3), produto gerado pela fermentação com *Bacillus subtilis*, apresenta estruturalmente um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β-hidróxi (13 a 15 átomos de carbono), o que permite diferentes homólogos e isômeros, seu principal componente é a ligação lactona do ácido 3 hidroxi-13-metil-tetradecanóico (ARIMA *et al.*, 1968; LANG, 2002; KOWALL *et al.*, 1998; KLUGE *et al.*, 1988; COSTA, 2005; BARROS *et al.*, 2007).

**Figura 3** – Estrutura química da molécula de surfactina (Nitschke e Pastore , 2002).



A surfactina apresenta atividade biológica que depende da composição e da forma como seus aminoácidos se organizam em cadeia e da estrutura de sua porção lipídica, onde qualquer mudança estrutural pode alterar suas propriedades (KOWALL *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 2007).

Outra característica inerente à surfactina é sua estabilidade frente à condições extremas de pH, temperatura, força iônica, pressão e presença de solventes orgânicos (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). A surfactina também apresenta baixa CMC, alto poder de redução da tensão superficial, além de diversas funções biológicas, como listado abaixo (ARIMA *et al.*, 1968; COOPER *et al.*, 1981; KIM *et al.*, 1997; COSTA, 2005;

NITSCHKE, 2004; BARROS *et al.*, 2007 ).

- Ação anticarcinogênica (BARROS, *et al.*, 2007);
- atividade antitumoral (NITSCHKE, *et al.*, 2004);
- inibição da formação de biofilmes de outras bactéria com sua ação antimicrobiana e antifúngica (STEIN, 2005);
- ação antibiótica (NITSCHKE, *et al.*, 2004);
- agente facilitador na absorção de fármacos (BARROS, *et al.*, 2007);
- atividade antiviral (BARROS, *et al.*, 2007).

Todas as propriedades apresentadas pela surfactina a caracterizam como uma molécula biologicamente ativa e possibilita sua aplicação em diversos setores industriais (BARROS, *et al.*, 2007).

Apesar de a surfactina ser muito citada como agente tensoativo em processos de remediação de águas e solos contaminados com poluentes orgânicos hidrofóbicos, o aumento de sua aplicação é limitada, pois sua toxicidade ainda não é conhecida, não se sabe como acontece a biodegradação dessas moléculas e de seus metabólitos intermediários e, é incompreensível a interação do surfactante com poluentes orgânicos, organismos e componentes do solo, o que manifesta carência de pesquisas sobre biodegradabilidade e toxicidade de surfactantes (HAIGH, 1996; DI GIOIA *et al.*, 2004; OU, 2000; LIMA, 2008).

Ao serem comparados aos surfactantes sintéticos, os tensoativos biológicos, em sua grande maioria, apresentam alta compatibilidade com as membranas biológicas, logo toxicidade inferior, principalmente ao citarmos as bactérias e outros organismos unicelulares, o que estimula a decomposição bacteriana de substâncias orgânicas hidrofóbicas (POREMBA *et al.*, 1991; MORAN *et al.*, 2000; HUA *et al.*, 2003; MAKKAR e ROCKNE, 2003; MULLIGAN, 2005; LIMA, 2008).

Ao realizar testes de toxicidade espera-se estabelecer o impacto das substâncias químicas em estudo sobre a biota do ambiente e, com a informação adquirida determinar o tipo de tratamento e forma de aplicação (LIMA, 2008).

Os testes de ecotoxicidade são bastante úteis, pois podem ser avaliados em um curto tempo (VAN BEELEN e DOELMAN, 1997). Dentre os bioensaios, tem-se o teste com *Artemia salina* (microcrustáceo de água salgada) e o de fitotoxicidade sobre *Lactuca sativa* (semente de alface), chamado de Teste de alongamento das raízes, ambos os testes

são simples e rápidos na resposta, além de apresentarem baixo custo de execução (LUNA *et al.*, 2005). Os ensaios de letalidade e os que levam em consideração a germinação são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA *et al.*, 2005; ANDRADE, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

## 2.7 Recuperação e elucidação estrutural da surfactina

Para a produção em larga escala, primeiramente, deve-se avaliar a quantidade de bio surfactante produzida aliada à sua recuperação, sabendo que este processo depende de fatores intrínsecos às moléculas bio surfactantes como, carga iônica, solubilidade e localização (intracelular, extracelular ou ligadas à parede celular) (DESAI e BANAT, 1997; LIMA, 2008).

Diversos mecanismos são aplicados nos processos de extração, como a precipitação com sal, extração por solvente, ultra-centrifugação, cromatografia de troca iônica, ultra-filtração, precipitação ácida e separação de espuma, sendo os dois últimos, os mais usados para a recuperação de bio surfactantes (REILING *et al.*, 1986; SHABTAI e GUTNICK, 1986; SEN e SWAMINATHAN, 2004; SEN e SWAMINATHAN, 2005; DUBEY, 2005; MUKHERJEE *et al.*, 2006; CHEN e JUAN, 2008; LIMA, 2008).

Embora muitos solventes sejam usados em processos de extração, o mais eficaz é a mistura de clorofórmio e metanol, em diferentes proporções, facilitando assim o ajuste da polaridade ao material a ser extraído, tornando o extrator mais específico (KUYUKINA *et al.*, 2001; MESQUITA, 2004; LIMA, 2008).

Ao ajustar o pH do meio ao ponto isoelétrico do composto desejado, é possível extraír, por precipitação ácida, a surfactina e outros bio surfactantes produzidos por *Bacillus* (MULLIGAN e GIBBS, 1990). Em estudo realizado por CHEN e JUAN (2008), a recuperação da surfactina produzida se deu por precipitação ácida seguida de extração líquido-líquido, no entanto, no sistema de ELL a purificação foi mais efetiva, provavelmente devido a uma pré-purificação com a adição do ácido ao meio.

A elucidação estrutural de bio surfactantes baseia-se em processos que acontecem em curtos intervalos de tempo e com pequenas quantidades de amostra, são eles: ressonância

magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com fase reversa, RMN e EM com Bombardeamento de Átomos Rápidos (FAB-MS) e, Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Tempo de Voo (MALDI-TOF) (BODOUR *et al.*, 2004; LIMA, 2008).

CHEN *et al.*, 2006 determinaram a estrutura da surfactina de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 por meio de técnicas unidimensionais de RMN  $^1\text{H}$  e de EM-FAB, já JAIN *et al.*, 2012, recuperaram o biossurfactante de *Klebsiella sp.* por diálise e determinou sua estrutura por espectroscopia de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e espectros de absorção na região do infravermelho.

## 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo, apresentam-se os materiais utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, assim como a metodologia empregada para a elucidação da estrutura molecular do bio surfactante produzido, para a caracterização físico-química, para o estudo das propriedades tensoativas e emulsionantes, e para a realização de testes toxicológicos do bio surfactante produzido. Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos – GPBio/DEQ/UFC, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN, no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste – LEMANOR e na EMBRAPA Agroindústria Tropical.

### 3.1 Produção do bio surfactante

#### 3.1.1 Substrato e meios de cultura

Foi utilizado suco de caju clarificado como meio de cultivo, obtido a partir de caju da espécie *Anacardium occidentale* L., fornecido pela Embrapa Agroindústria Tropical da Universidade Federal do Ceará.

A cepa *Bacillus sp.*, nomeada LAMI005, proveniente da coleção de culturas do Laboratório de Embriologia e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, foi mantida em meio APGE (peptona 5,0 g.L<sup>-1</sup>, glicose 5,0 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2,5 g.L<sup>-1</sup> e ágar 15,0 g.L<sup>-1</sup>) e incubada em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas e após, mantida sob refrigeração a 4°C, sendo repicada a cada 60 dias.

Para a propagação do inoculo, o micro-organismo mantido sob refrigeração, foi reativado em placas contendo meio APGE e incubado em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas. Após este período, tempo em que a bactéria encontra-se na sua fase exponencial de

crescimento conforme OLIVEIRA (2010), três alçadas da cultura foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio estéril para o inoculo.

Os meios de cultura utilizados para a propagação do inoculo do micro-organismo *Bacillus subtilis* LAMI005 e para a produção de biossurfactante, foram elaborados de acordo com OLIVEIRA *et al.*, (2013), aonde usou-se suco de caju clarificado com concentração de ART (Açúcares Redutores Totais) de 22,92 g.L<sup>-1</sup> e sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> como suplementação de fonte de nitrogênio. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH (3 mol.L<sup>-1</sup>) ou HCl (3 mol.L<sup>-1</sup>) e esterilizado em autoclave a 110°C por 10 minutos.

### **3.1.2 Produção do biossurfactante**

A densidade óptica do inoculo foi medida a 600 nm em espectrofotômetro (Spectronic® 20 Genesys) e ajustada a uma faixa entre 0,10 – 0,20 a partir de diluições com o meio de cultivo, para a padronização do número de células iniciais utilizadas em cada experimento. A produção do biossurfactante foi realizada de acordo com OLIVEIRA *et al.*, (2013) com modificações, onde em frascos de Erlenmeyer de 500 mL foram adicionados 10% de inoculo ao meio de cultivo para um volume final de 200 mL. Logo após, os frascos inoculados foram incubados em agitador orbital a 180 rpm, 30°C por 48 horas em condições isotérmicas.

## **3.2 Extração e purificação do biossurfactante**

### **3.2.1 Extração líquido-líquido**

A extração do biossurfactante produzido foi realizada após a remoção das células do meio por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. A extração primária do

biossurfactante foi realizada por precipitação ácida, ajustando-se o pH do meio para 2,0 com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> de acordo com COSTA (2005), seguido de incubação a 4°C “overnight”. O biossurfactante precipitado, chamado de biossurfactante bruto, foi recuperado por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4°C.

Após, o biossurfactante bruto foi submetido a um processo de extração líquido-líquido de acordo com YEH *et al.* (2005). Uma solução de biossurfactante em água deionizada pH 8,0 e, cloreto de metileno, na proporção 1:1, foram colocados em funis de separação, agitados por 5 minutos para homogeneização e deixados em repouso por uma hora para a separação das fases. A fase contendo surfactina e solvente foi coletada em um bêquer. Estas operações foram repetidas três vezes.

Após evaporação do solvente, o extrato foi ressuspensido em álcool metílico e filtrado em membrana (0,45 µm, Millipore, USA) e após evaporação do solvente, obteve-se o biossurfactante semi-purificado.

### **3.2.2 Cromatografia em coluna de fase reversa C18**

Para a obtenção do biossurfactante purificado, 300 mg do biossurfactante semi-purificado foram diluídos em 8 mL de metanol P.A., filtrado em membrana (0,45 µm, Millipore, USA) e submetido à cromatografia de fase reversa utilizando cartucho de octadecil-sílica (HyperSep C18, 10 g/75 mL) como mostra a Figura 4.

**Figura 4** – Coluna cromatográfica de fase reversa utilizada para a purificação do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju.



A eluição foi realizada com a mistura de solventes CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (8:2), CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (9:1) e finalmente CH<sub>3</sub>OH. Foram coletadas 41 frações em frascos de vidro, no volume de 5 mL cada. Todas as frações foram analisadas visualmente e as que apresentaram precipitado branco foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Após análise por CLAE, com metodologia descrita por SOUSA (2011), as frações 29 a 35 foram reunidas e denominadas de F:29-35. O biossurfactante purificado foi devidamente quantificado e submetido às análises espectroscópicas, tais como: espectroscopia na região do infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR). Os espectros foram comparados com os dados de IV e RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) da literatura de uma surfactina.

### 3.3 Análise estrutural do biossurfactante

#### 3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espetrômetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum 1000, utilizando-se pastilhas de KBr.

#### 3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C), unidimensionais, foram obtidos em espetrômetros de marca Bruker modelo Avance DPX300, operando na freqüência de hidrogênio a 300 MHz e na freqüência do carbono 75 MHz, localizado no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará. O solvente deuterado utilizado na dissolução das substâncias foi piridina (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), comercializado pela companhia Cambridge Isotope Laboratories. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em

ppm e referenciados para RMN  $^1\text{H}$  pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas do solvente piridina (7,22; 7,58 e 8,73 ppm). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 do solvente piridina ( $\delta$ 150,35; 135,91; 123,87).

### 3.3.3 Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR)

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry – Ion Trap – Time of Flight) (225-07100-34) - SHIMADZU, equipado com fonte de ionização por electrospray.

## 3.4 Caracterização físico-química do biossurfactante

### 3.4.1 Tensão superficial e determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica do biossurfactante bruto foi determinada pelo ponto central de inflexão da curva do gráfico dado pela variação da tensão superficial em função da concentração do biossurfactante semi-purificado. A tensão superficial foi medida segundo o método de anel de Du Noüy, onde foi utilizado um tensímetro Krüss modelo K6 (COSTA *et al.*, 2006). Baseando-se em SANTA ANNA *et al.* (2002), diluições sucessivas de solução na concentração inicial de 250 mg.L $^{-1}$  de biossurfactante em água deionizada pH 8,0, tiveram a tensão superficial medida em triplicata, até alcançar um valor constante e este se aproximar da tensão superficial da água (72 mN.m $^{-1}$ ), sendo os resultados representados por média e desvio.

### 3.4.2 Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão

A capacidade de emulsificação do biossurfactante foi avaliada segundo a metodologia descrita por COOPER e GOLDENBERG (1987), na qual 2 mL de hidrocarboneto líquido, puro ou em mistura (querosene, n-hexadecano, heptano, tolueno, óleo diesel e gasolina) e 2 mL de uma solução de biossurfactante semi-purificado na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, foram misturados em tubos de ensaio e agitados por dois minutos em vortex, permanecendo em repouso por 24 horas. Em seguida mediu-se a altura da emulsão formada. A estabilidade da emulsão foi avaliada em intervalos de tempo até 96 horas após o início do ensaio. O índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>) foi determinado de acordo com a Equação 1, proposta por WEI *et al.* (2005).

$$\text{IE}_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100 \quad (1)$$

sendo  $H_{FE}$  a altura da fase emulsionada após 24 horas e  $H_{TOTAL}$  a altura total da solução.

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

Os efeitos significantes do tempo de estabilização das emulsões formadas com o biossurfactante e diferentes fontes hidrofóbicas foram determinados através de recursos estatísticos, análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, com nível de significância de 95%, usando o programa Microcal Origin 8.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA).

### 3.4.3 Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeito do pH, da salinidade e da temperatura)

A avaliação da estabilidade do biossurfactante semi-purificado foi realizada de acordo com as metodologias propostas por APARNA *et al.* (2012) e BARROS *et al.* (2008) com modificações.

Os efeitos de diferentes valores de pH (2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12), concentrações salinas (0; 2,5; 5; 10; 15 e 20%) e temperaturas (4, 25, 50, 75, 100 e 121°C por 30 minutos) foram avaliados quanto à tensão superficial e índice de emulsificação de acordo com o descrito nos itens 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente. O estudo realizado a partir de uma solução aquosa de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> do biosurfactante, teve seus resultados obtidos em triplicata.

Os efeitos significantes das diferentes condições nas quais o biosurfactante foi submetido foram determinados através de recursos estatísticos, análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, com nível de significância de 95%, usando o programa Microcal Origin 8.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA).

### 3.5 Diagramas de fases

A construção do diagrama de fases foi baseada em SOUSA (2011). A solução de surfactina na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> foi misturada, em tubos de ensaio fechados, a compostos hidrofóbicos (diesel ou querosene), nas proporções de 20 a 90% de solução de biosurfactante. Foram homogeneizados, sob agitação máxima, em vortex por 2 minutos. Os tubos foram submetidos às temperaturas de 30 a 90°C, variando-se em 5°C, em banho termostatizado, com um tempo de estabilização de 10 minutos para cada alteração na temperatura. As fases existentes (emulsão, água, óleo e outra) foram verificadas e suas determinações se deram de forma visual, utilizando uma lanterna de luz branca, para melhor verificação da mudança de fase. A partir da fase existente em determinada proporção e temperatura, os diagramas de fases foram construídos.

### 3.6 Testes de toxicidade

Como os surfactantes biológicos podem ser usados como agentes remediadores ao solo e à água contaminados com petróleo, na indústria de alimentos, na agricultura, em indústria farmacêutica e de cosméticos (BARROS *et al.*, 2007), foram realizados testes de

toxicidade devido à necessidade de medir os riscos toxicológicos do biosurfactante. Foram utilizados dois organismos diferentes: semente de alface (*Lactuca sativa*) e microcrustáceo *Artemia salina*, por serem organismos fáceis de ser cultivados e muito utilizados em testes de toxicidade, com vasta disponibilidade de dados para comparação. Os dois testes realizados estão descritos a seguir.

### **3.6.1 Teste de germinação com *Lactuca sativa***

Os experimentos foram realizados de acordo com SILVA *et al.* (2010) com modificações. O método, denominado teste de alongamento das raízes, leva em consideração o comprimento das raízes após 5 dias de exposição ao agente tóxico e o número de sementes que germinaram durante este período.

#### **3.6.1.1 Procedimento de teste**

Soluções testes foram preparadas com água destilada pH 8,0 nas concentrações de 500, 350, 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg.L<sup>-1</sup> do biosurfactante semi-purificado, como controle foi utilizada água destilada.

Em placas de petri foram colocados papel de filtro, estes foram umedecidos com 5 mL da solução teste e foram distribuídas dez sementes, conforme mostra a Figura 5. Para cada concentração foram preparadas 5 placas. As placas foram colocadas em câmara de germinação, na ausência de luz e com temperatura controlada na faixa de 24 ± 1°C. No terceiro dia de incubação foi adicionado mais 1 mL da solução teste em cada placa para a manutenção da umidade do papel. O tempo total de duração do teste foi de 120 horas.

**Figura 5** – Esquema de distribuição das sementes para a realização do teste de toxicidade aguda por meio do índice de germinação e alongamento das raízes de alface *Lactuca sativa*.



Após o período de incubação, as sementes que germinaram foram contadas e o comprimento das raízes foi medido. As medidas foram realizadas do ponto de transição entre o hipocólito e a extremidade da raiz.

Relacionando-se o percentual de sementes germinadas com as medidas do alongamento das raízes, calculou-se o Índice de Germinação (IG) conforme Equações 2, 3 e 4 (SILVA *et al.*, 2010). Considerando que valores de IG de 80% são utilizados como indicadores de não fitotoxicidade (TIQUIA *et al.*, 1996).

$$\%IG = \frac{(\%GS)x(\%CR)}{100} \quad (2)$$

$$\%GS = \left( \frac{\%GE}{\%GC} \right) x 100 \quad (3)$$

$$\%CR = \left( \frac{MCE}{MCC} \right) x 100 \quad (4)$$

Sendo:

%GS = Porcentagem de germinação de sementes, adimensional;

%GE = Porcentagem de germinação no extrato, adimensional;

%GC = Porcentagem de germinação no controle, adimensional;

%CR = Porcentagem de crescimento da raiz, em mm;

MCE = Crescimento no extrato (média), em mm;

MCC = Crescimento no controle (média), em mm.

### 3.6.2 Bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina*

O ensaio de citotoxicidade sobre *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada usada como alimento para organismos aquáticos, foi realizado com base em MEYER *et al.* (1982) com modificações.

Preparou-se uma solução com sal marinho na concentração de 3 g.L<sup>-1</sup> e pH entre 8 e 9, para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 24 horas, com aeração constante a 25°C.

Cerca de 10 larvas foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 mL de solução nas seguintes concentrações do biossurfactante semi-purificado: 750, 500, 350, 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg.L<sup>-1</sup>. O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas.

Ajustou-se uma equação linear simples aos dados de porcentagem das larvas de *Artemia salina* mortas em relação ao aumento da concentração da solução de surfactina. Com esse ajuste foi possível calcular em que concentração de extrato 50% das artêmias morriam (CL<sub>50</sub>). O teste foi acompanhado de um controle negativo, onde as larvas foram incubadas somente em água salina.

### 3.7 Aplicação do biossurfactante na remoção de hidrocarbonetos contaminantes de areia

A aptidão do biossurfactante semi-purificado para remoção de hidrocarbonetos contaminantes de areia foi estudada frente a dois hidrocarbonetos (petróleo e diesel). Porções de areia foram artificialmente contaminadas com 10% de um dos hidrocarbonetos, petróleo ou diesel, de acordo com o método descrito por SILVA *et al.* (2010). Porções de 20 mg de areia contaminada foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL e acrescidos de 40 mL de solução de surfactante em diferentes concentrações (12,5 mg.L<sup>-1</sup> (CMC), 37,5 mg.L<sup>-1</sup> (3CMC)

e um controle com água destilada). Os Erlenmeyer foram incubados em agitador orbital a 150 rpm, por 24 horas a 27°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 9000 g, por 20 minutos para separação da solução de lavagem e da areia. O óleo que não conseguiu ser extraído da areia por ação do biossurfactante, foi removido com hexano e sua determinação se deu gravimetricamente (NISTCHKE e PASTORE, 2002).

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, apresentar-se-ão os resultados e as discussões referentes aos experimentos realizados.

Inicialmente serão apresentados os resultados quanto à caracterização estrutural do bio surfactante obtida a partir de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho, a fim de elucidar e equiparar a estrutura do surfactante produzido com a surfactina padrão (Sigma). Em seguida, expõem-se os estudos das propriedades tensoativas, estabilidade quanto às emulsões formadas e quanto às diferentes condições ambientais como, temperatura, salinidade e pH. Após, apresentam-se os resultados obtidos em bioensaios com *Artemia salina*, com o intuito de se estabelecer a CL<sub>50</sub>, e *Lactuca sativa*. E, por último, são demonstrados os resultados obtidos do poder do bio surfactante em remover contaminantes hidrofóbicos de areia contaminada.

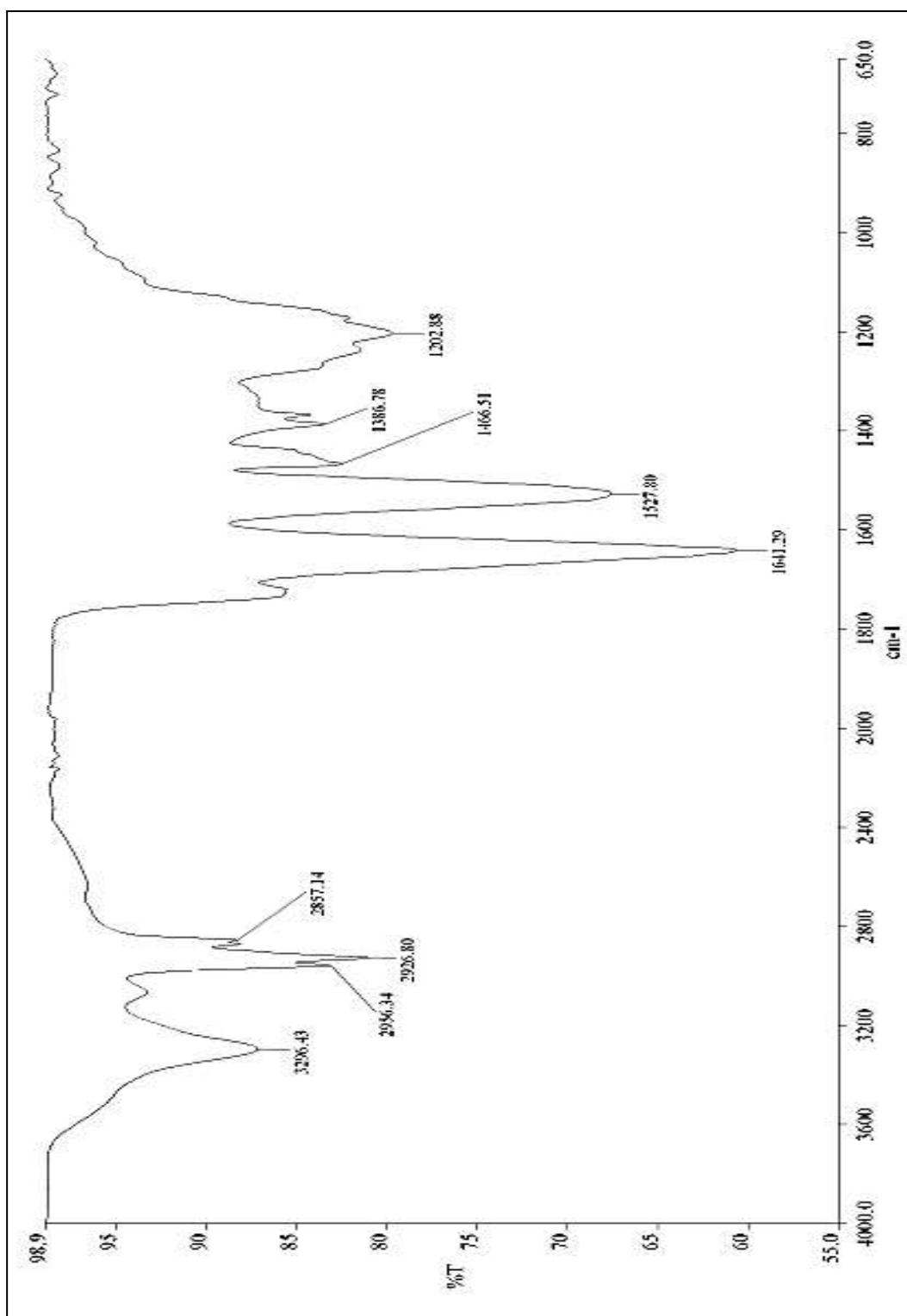
### 4.1 Caracterização estrutural do bio surfactante purificado

Para dar início ao processo de caracterização, diversas etapas foram realizadas a fim de se alcançar um produto maximamente livre de qualquer impureza ou interferente. Partindo-se de uma massa inicial de 300 mg do bio surfactante semi-purificado para a realização da cromatografia em coluna fase reversa C18, foram obtidos 33,5 mg de surfactina purificada. A partir dessa massa foi possível a caracterização do bio surfactante produzido.

O espectro de absorção na região do infravermelho da fração 29-35 (Figura 6) apresentou uma absorção em 3.296 cm<sup>-1</sup>, característico de deformação axial de ligação N-H presente em peptídeos; absorção em 2.956 cm<sup>-1</sup> correspondente a estiramento assimétrico da ligação C–H de grupamento CH<sub>3</sub>; banda em 2.926 cm<sup>-1</sup> característica de estiramento assimétrico da ligação C–H de grupamento CH<sub>2</sub>; absorção em 2.857 cm<sup>-1</sup> correspondente a deformação axial simétrica de ligação C–H de grupamento CH<sub>2</sub>. Banda de deformação axial C=O em 1.730 cm<sup>-1</sup> de ácido carboxílico. Duas absorções intensas uma em 1.641 que caracteriza uma amida I e outra em 1.527 cm<sup>-1</sup> característica de amida II . Todas as bandas de

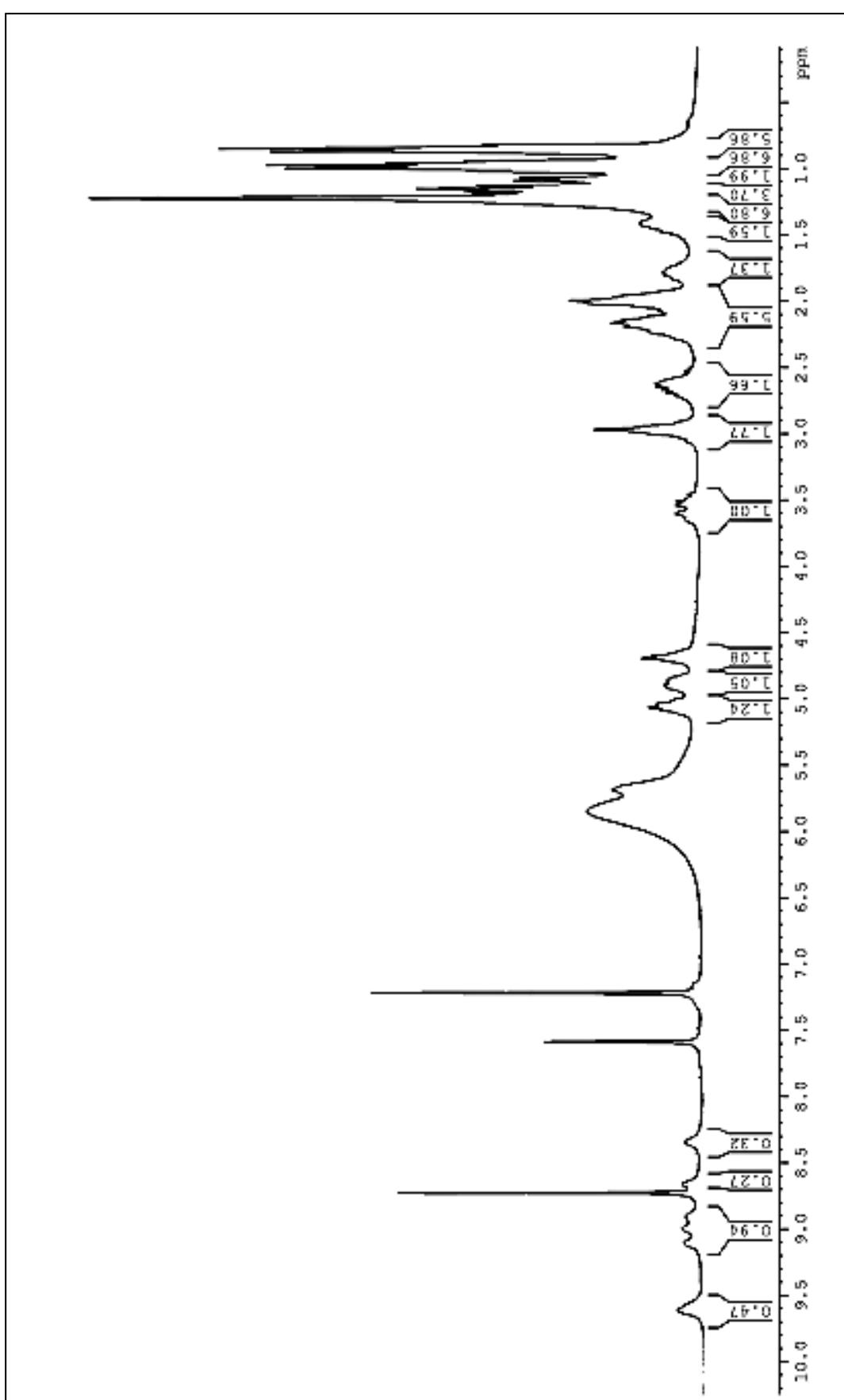
absorção são condizentes com as obtidas por OLIVEIRA *et al.* (2013), que também produziu surfactina a partir do suco de caju clarificado.

**Figura 6** – Espectro de infravermelho da fração F:29-35 (biossurfactante purificado).



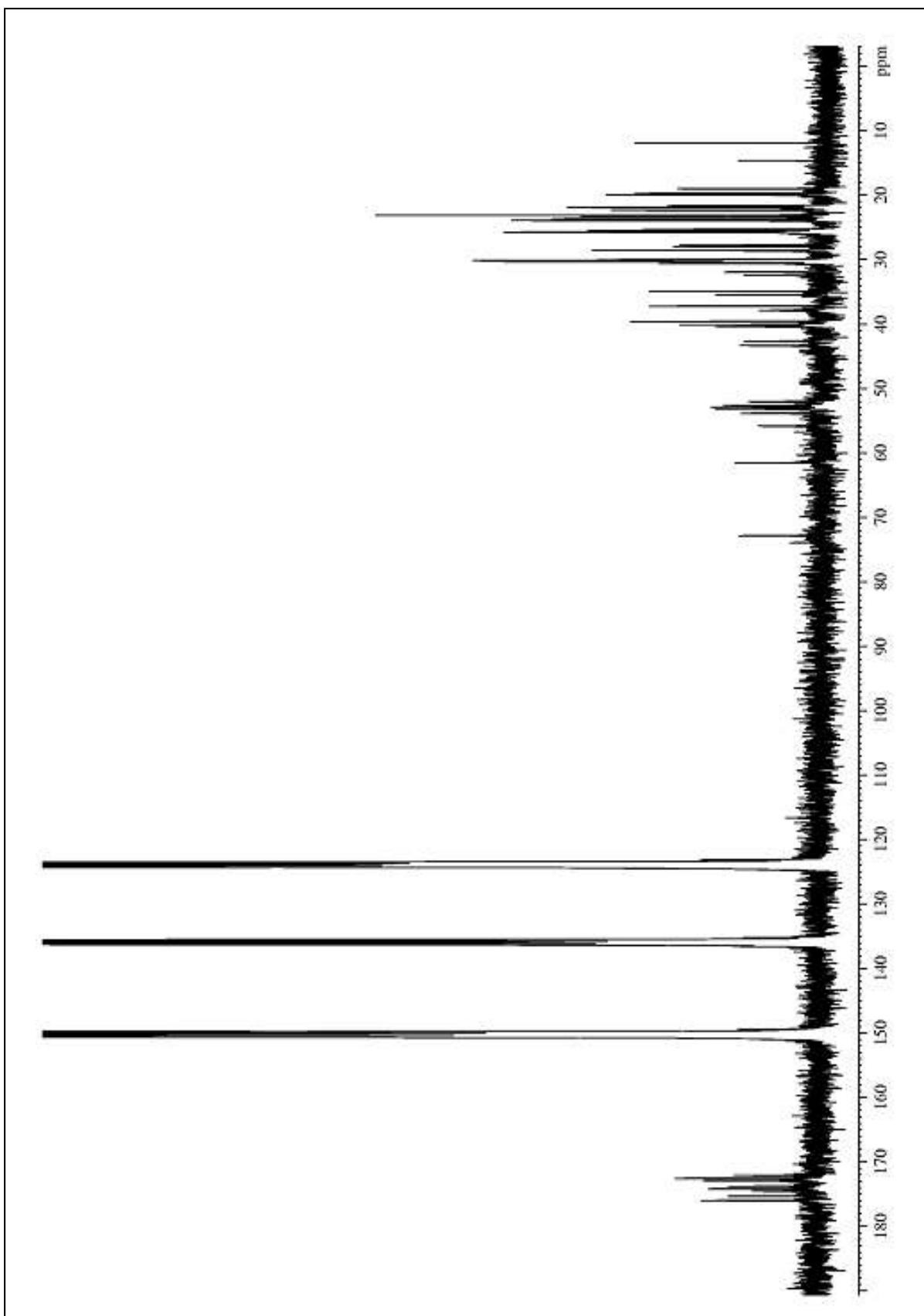
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $d_5$ ) (Figura 7) das frações 29-35 apresentaram sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  8,31 e 9,6 ppm (N-H), referente a hidrogênio ligado a átomo de nitrogênio de função amida monossubstituída, além de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  5,6 a 3,4 ppm de hidrogênios ligados ao carbono  $\alpha$  da carbonila, típicos de aminoácidos. Sinais sobrepostos entre  $\delta_{\text{H}}$  1,8 a 1,2 ppm indicam grupos metilênicos de hidrocarbonetos condizente com a cadeia alifática presente na estrutura de surfactinas, bem como sinais em 1,1-0,8 ppm referente a hidrogênios de grupos metilas. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,22; 7,58 e 8,73 ppm, pertencem às moléculas residuais não-deuteradas do solvente piridina.

**Figura 7** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração F:29-35 (300 MHz, piridina-*d*5).



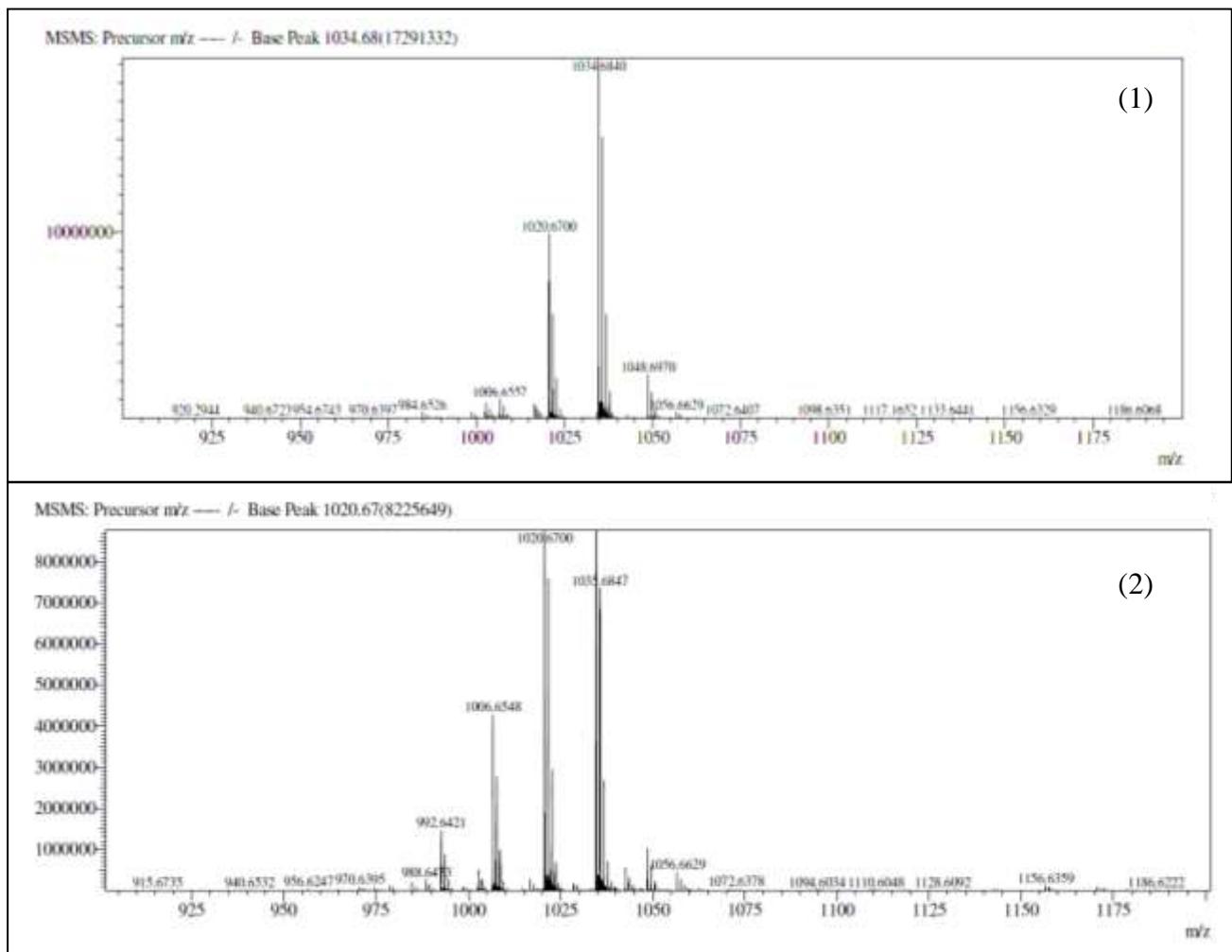
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, piridina-*d*5) (Figura 8) mostrou dez linhas espectrais entre  $\delta_{\text{C}}$  176,0 – 172,1 ppm, característicos de grupo carbonila (C=O) de função amida, éster e ácido carboxílico presente nos aminoácidos. Um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,8 ppm de carbono carbinólico (C-O), sete sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  61,6 a 52,0 condizentes com carbonos ligados a nitrogênio (C-N) de aminoácidos, sinais entre 43,3 a 25,8 compatíveis com grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), dentre outros na região de 25,5 a 11,8 ppm para grupos metínicos (CH) e metilas ( $\text{CH}_3$ ). Os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 do solvente piridina ( $\delta$  150,35; 135,91 e 123,87).

**Figura 8** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração F:29-35 (75 MHz, piridina-*d*5).



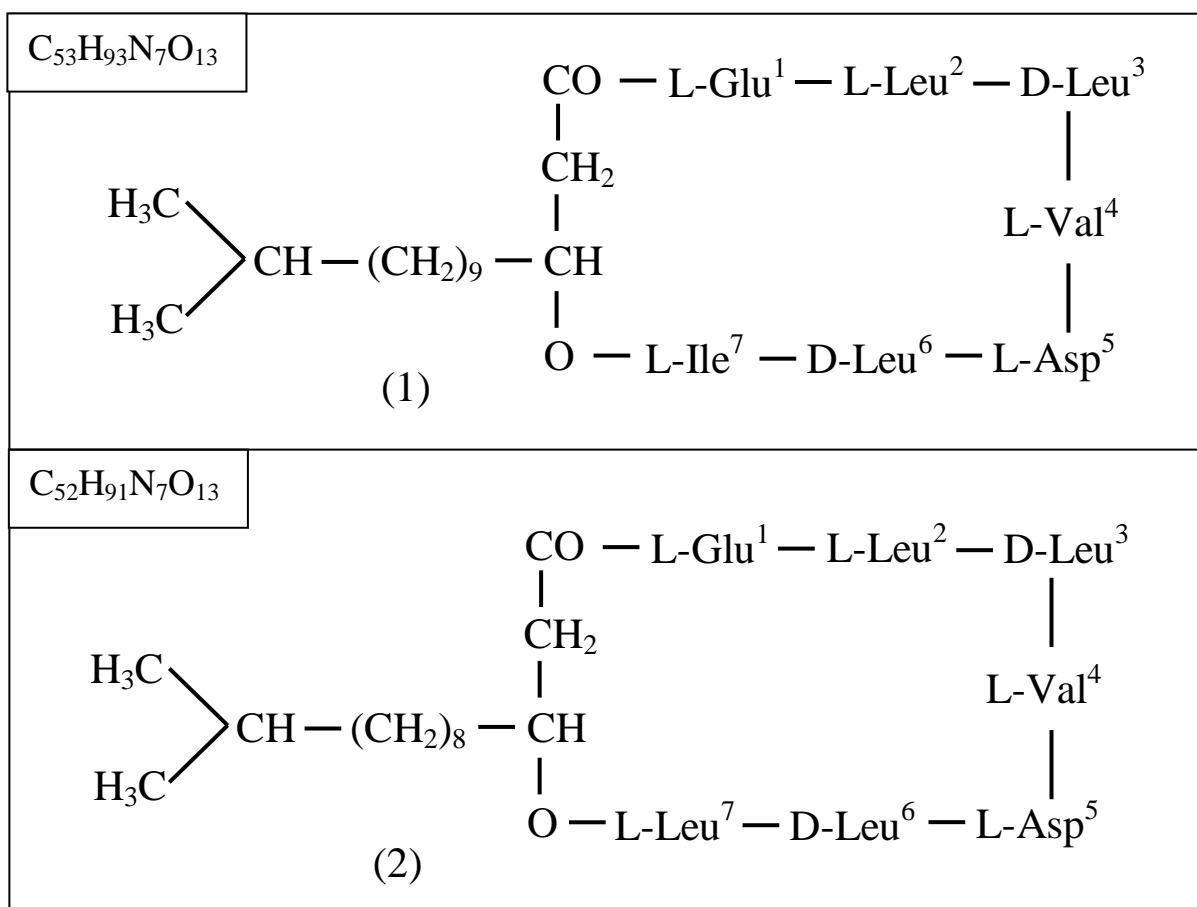
O espectro de massa de alta resolução (EMAR), obtido com ionização por eletrospray e no modo negativo, mostrou picos em  $m/z$  1034,6840 e 1020,6700 [M - H] $^-$ , como mostra a Figura 9.

**Figura 9** – Espectro de massa de alta resolução. (1) fração 29-35; (2) surfactina padrão (Sigma).



A presença dos picos nos espectros mostrados na Figura 9 indicam as fórmulas moleculares  $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$  e  $C_{52}H_{91}N_7O_{13}$  para o biosurfactante produzido e para a surfactina padrão da Sigma, respectivamente, onde o lipopeptídeo produzido neste trabalho difere da amostra padrão (Sigma) quanto ao número de grupos metilênicos (-CH<sub>2</sub>-) presente na cadeia alifática, apresentando um a mais.

As fórmulas moleculares encontradas após a obtenção dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e EMAR com posterior comparação com os espectros da surfactina obtida comercialmente, são as mesmas encontradas por Itokawa *et al.* (1994), Figura 10.

**Figura 10** – Estruturas de [Ile]Surfactina (1) e [Leu] Surfactina (2).

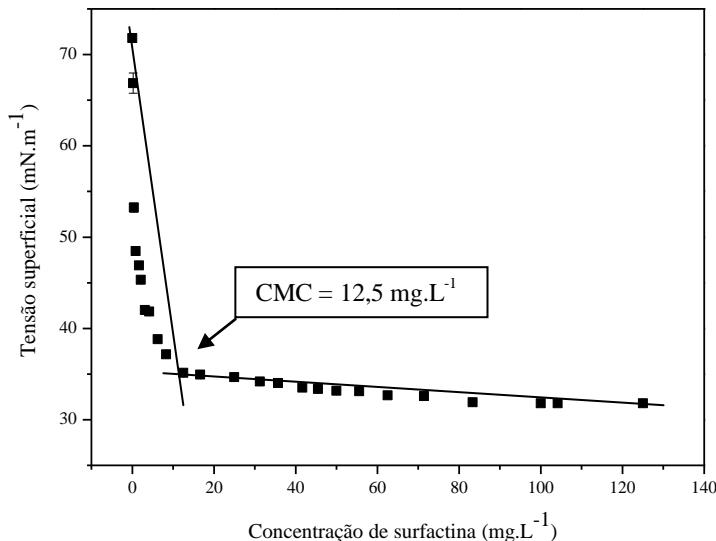
Fonte: Itokawa *et al.* (1994).

#### 4.2 Tensão superficial e determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Ao caracterizar um tensoativo, a propriedade mais relevante é a sua eficiência na redução da tensão superficial ou interfacial, e a concentração micelar crítica (CMC) é o parâmetro mais utilizado na avaliação dessa atividade surfactante (MEDEIROS, 2007).

A CMC foi determinada pelo ponto central de inflexão da curva do gráfico dado pela relação entre a variação da tensão superficial e a concentração da solução do bio surfactante semi-purificado, os resultados são apresentados na Figura 11.

**Figura 11** – Concentração Micelar Crítica (CMC) da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju clarificado. Barras de erro representam o desvio padrão.



O bio surfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial, já que este foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 31,8 mN.m<sup>-1</sup> e a tensão interfacial do n-hexadecano de 27 para 2 mN.m<sup>-1</sup>, reduções de 55,8 e 92,6%, respectivamente.

Observa-se na Figura 11 que o aumento da concentração do bio surfactante produzido provocou uma diminuição gradativa da tensão superficial até o ponto na qual a CMC foi atingida, 12,5 mg.L<sup>-1</sup>, a partir deste, mesmo com o aumento da concentração de surfactina, não há redução adicional da tensão superficial. Indicando a eficiência do bio surfactante produzido, pois segundo MULLIGAN e GIBBS (1993), a CMC dos bio surfactantes mais eficazes varia entre 1 e 200 mg.L<sup>-1</sup>.

O bio surfactante produzido neste trabalho demonstrou maior capacidade de redução da tensão superficial do que os surfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em estudos realizados por KIM *et al.* (1997) e por COOPER *et al.* (1981), obtendo concentrações micelares críticas de 40 e 25 mg.L<sup>-1</sup>. Porém, os dados reportados por COSTA (2005) onde o valor da CMC foi igual a 10 mg.L<sup>-1</sup> e por NITSCHKE (2004) onde a CMC alcançou o valor de 11 mg.L<sup>-1</sup>, apresentam valores próximos ao encontrado. O valor da redução da tensão interfacial foi superior ao encontrado por AL-BAHRY *et al.* (2012), onde o bio surfactante produzido por *Bacillus subtilis* B20 foi capaz de reduzir a tensão interfacial do sistema

água/n-hexadecano para 5,02 mN.m<sup>-1</sup>. A CMC encontrada também mostrou-se inferior a CMC de outros surfactantes produzidos pela mesma espécie de bactéria, *Bacillus subtilis*, descritos na literatura, considerando o valor encontrado de 40 mg.L<sup>-1</sup> em trabalho desenvolvido por VAZ e colaboradores (2012), enquanto que a CMC do biosurfactante produzido em trabalho desenvolvido por BARROS *et al.* (2008) foi igual 12 mg.L<sup>-1</sup>, semelhante à obtida no presente trabalho.

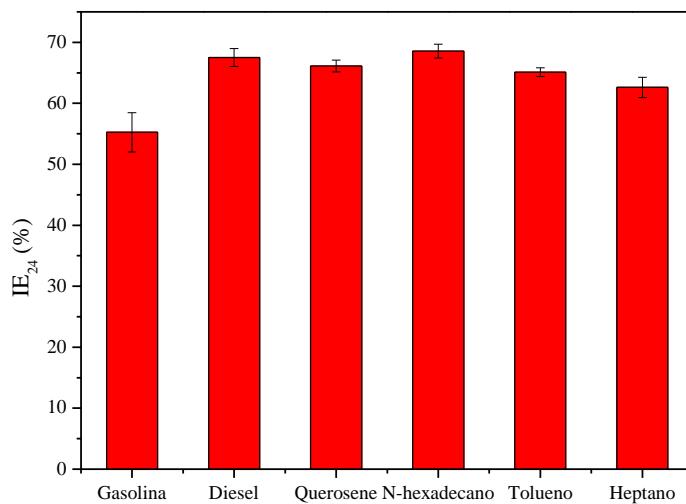
A partir dos dados relacionados é possível afirmar que o biosurfactante produzido a partir do suco de caju clarificado apresenta grande atividade superficial e interfacial e baixa CMC, propriedades estas que o caracterizam como um efetivo agente tensoativo. Vale salientar que o valor da CMC depende do grau de pureza da surfactina utilizada e da natureza do solvente utilizado em sua solubilização (CARILLO *et al.*, 2003; FOX E BALA, 2000).

#### 4.3 Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão

Apesar da capacidade de uma molécula na formação de uma emulsão estável nem sempre estar associada à sua aptidão em reduzir a tensão superficial, a estabilização de uma emulsão óleo/água é normalmente utilizada como um indicador da atividade de superfície (YOUSSELF *et al.*, 2004).

A partir de uma análise inicial da Figura 12 observa-se que o biosurfactante produzido foi capaz de formar emulsões estáveis com hidrocarbonetos líquidos, pois após 24 horas da formação da emulsão, seus volumes ainda correspondiam a 50% ou mais da emulsão original (WILLUMSEN e KARLSON, 1997).

**Figura 12** – Índice de Emulsificação ( $IE_{24}$ ) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com biossurfactante de *Bacillus subtilis* LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão.



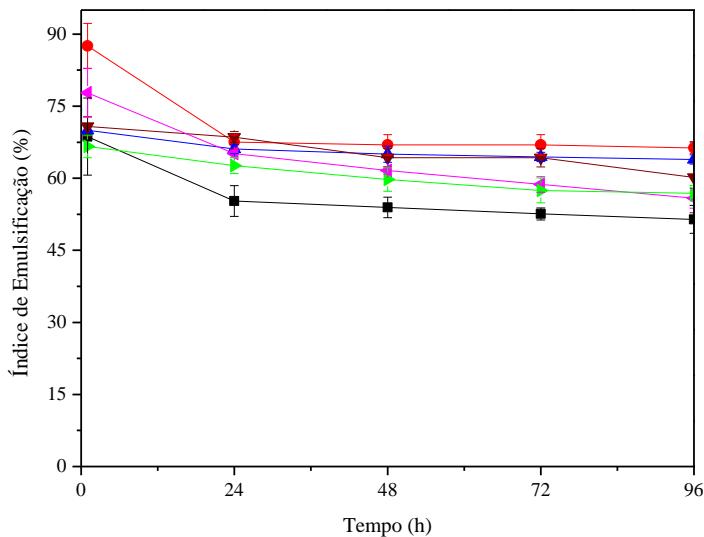
O biossurfactante apresentou alta capacidade para estabilizar emulsões com diesel e querosene ao longo de 24 horas, comprovada pelos altos índices de emulsificação obtidos (67,5 e 66,1%), com gasolina o índice de emulsificação embora superior a 50%, apresentou o menor valor obtido, igual a 55,2% (Figura 11). De acordo com BARROS *et al.* (2008), a diferença entre os comportamentos da emulsão com diesel e com gasolina pode ser explicada pela diferença de massa molecular, o diesel apresenta massa molecular maior que a gasolina, o que sugere uma emulsão mais estável quando da mistura de biossurfactante com hidrocarbonetos de cadeia longa.

O biossurfactante também foi capaz de emulsionar eficientemente n-hexadecano, tolueno e heptano. A formação de emulsões estáveis do biossurfactante com os hidrocarbonetos puros é refletida pelos altos valores de  $IE_{24}$  obtidos (Figura 12). A emulsão formada com tolueno apresentou  $IE_{24}$  igual a 65,1%, já com o n-hexadecano o  $IE_{24}$  alcançou o valor de 68,6% e com o heptano o valor foi de 62,6%.

No que diz respeito à estabilidade, demonstrada na Figura 13, não se observou redução percentual significativa, na qual todas as emulsões formadas apresentaram redução percentual no índice de emulsificação menor que 10% no período de 24 a 96 horas, exceto a emulsão formada com tolueno e n-hexadecano que apresentaram redução de 14,25 e 12,22%, respectivamente. A gasolina apresentou redução de 6,88%, já o diesel teve uma redução de 1,77%, o querosene reduziu 3,47% e o heptano 9,1%.

A emulsão formada com n-hexadecano não apresentou redução percentual significativa em nenhum dos intervalos de tempo estudados. Já as emulsões formadas com querosene, gasolina e diesel, apresentaram redução percentual significativa nos intervalos de tempo de 1 a 24, 1 a 48, 1 a 72 e 1 a 96 horas, fato que deve ser desconsiderado uma vez que 1 hora não é tempo suficiente para a estabilização de uma emulsão. No estudo realizado, a emulsão formada com tolueno foi a única que apresentou diferença significativa no intervalo de 24 a 96 horas (ANEXO B).

**Figura 13** – Estabilidade da emulsão, até 96 horas, com diferentes hidrocarbonetos. (■) gasolina, (●) diesel, (▲) querosene, (▼) n-hexadecano, (◀) tolueno e (▶) heptano. Barras de erro representam o desvio padrão.



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

#### 4.4 Efeito do pH, da força iônica e da temperatura na atividade do biossurfactante

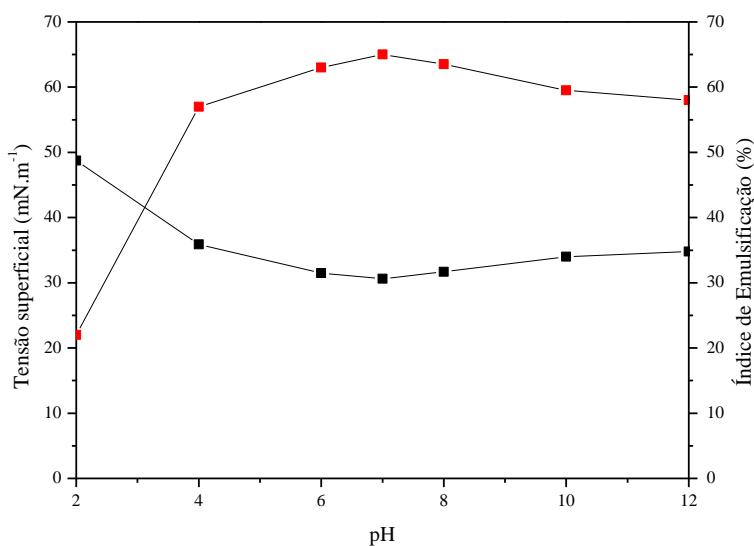
A estabilidade e a efetividade do biossurfactante foram avaliadas frente a variações de pH, temperatura e força iônica, por meio da análise da estabilidade da emulsão formada com diesel e da variação da atividade superficial.

Diversos fatores podem afetar a estabilidade de uma emulsão, e essa instabilidade conduz à quebra da emulsão ou inversão de fases (ROSEN, 2004; ILORI *et al.*, 2005). Ser capaz de preservar a estabilidade sob condições não ideais é importante para os surfactantes, uma vez que sua aplicação requer um comportamento constante (MORAIS, 2012).

##### 4.4.1 Efeito do pH

A estabilidade do biossurfactante produzido em relação à variação do pH, é mostrada na Figura 14.

**Figura 14** – Efeito da variação do pH no Índice de Emulsificação de emulsão formada com diesel (■) e na atividade superficial (■) do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão.



A atividade tensoativa do biossurfactante foi mantida na faixa de pH 6 a 8 com pequenas variações nos valores de tensão superficial e nos índices de emulsificação ( $IE_{24}$ ), embora apresentem diferença significativa, conforme mostrado em ANEXO C, os resultados obtidos encontram-se entre valores que ainda apresentam uma boa atividade emulsificante. Em pH 6, o biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de  $72\text{ mN.m}^{-1}$  para  $31,5\text{ mN.m}^{-1}$ , já em pH 7 esta redução foi para  $30,6\text{ mN.m}^{-1}$  e em pH 8 a redução atingiu o valor de  $31,6\text{ mN.m}^{-1}$ . Quanto ao índice de emulsificação os valores foram de 63; 65 e 63,5%, para os pH iguais a 6, 7 e 8, respectivamente, apresentando diferença significativa ao nível de significância de 95% (ANEXO C).

Em condições ácidas mais drásticas, ou seja, valores de pH igual a 2,0 e 4,0, o biossurfactante apresentou redução na estabilidade da emulsão, sendo estes valores iguais a 22 e 35,9%, respectivamente, apresentando diferença significativa ao nível de significância de 95% (ANEXO C). ANTUNES (2007) observou que baixos valores de pH alteram as forças eletrostáticas envolvidas na formação de emulsões causando instabilidade. Quanto à tensão superficial, esta aumentou significativamente com a redução do pH a valores iguais a 2,0 e 4,0, fato que pode ser explicado pela precipitação da surfactina em meio ácido (BARROS *et al.*, 2008).

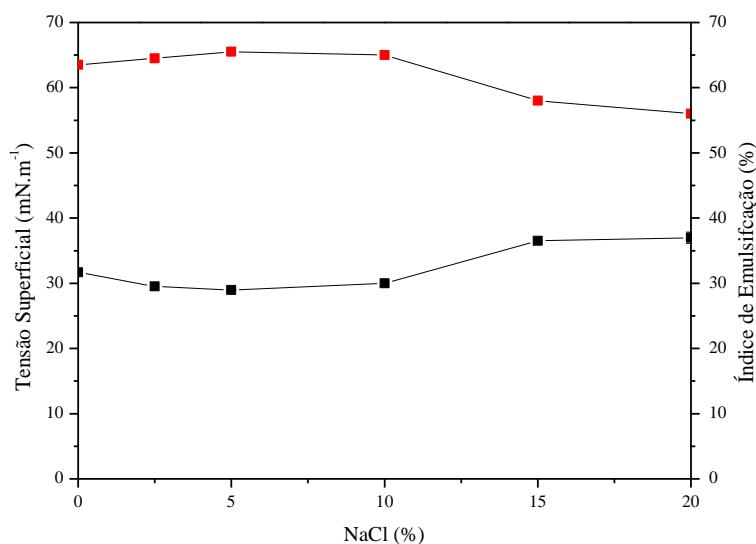
Em condições alcalinas mais drásticas, ou seja, valores de pH igual a 10 e 12, também houve aumento na tensão superficial e redução na capacidade de emulsificação do biossurfactante, apresentando também diferença significativa ao nível de significância de 95% (ANEXO C). Em pH 10, o biossurfactante reduziu a tensão superficial para  $34\text{ mN.m}^{-1}$  e obteve um índice de emulsificação igual a 59,5%, já em pH 12 a tensão superficial foi reduzida para 34,8 e o índice de emulsificação foi igual a 58%.

BARROS *et al.* (2008) relataram que tanto as amostras ácidas como as básicas, quando neutralizadas novamente, apresentaram uma redução da tensão superficial para valores semelhantes aos encontrados antes da redução ou do aumento do pH, demonstrando que ocorre apenas uma precipitação e que o biossurfactante volta a se solubilizar com a neutralização da amostra, reduzindo assim a tensão superficial.

#### 4.4.2 Efeito da força iônica

O efeito da adição de NaCl, em concentrações variando de 0 a 20%, na estabilidade da emulsão e na tensão superficial também foi estudado (Figura 15).

**Figura 15** – Efeito da variação da força iônica no Índice de Emulsificação de emulsão formada com diesel (■) e na atividade superficial (■) do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005. Barras de erro representam o desvio padrão.



O índice de emulsificação do biossurfactante permaneceu estável em soluções de 2,5 a 10% (m/v) de NaCl, onde alcançou IE<sub>24</sub> de 65%, e apresentou diferença significativa em soluções de 15 e 20% (m/v) de NaCl, ao nível de significância de 95% (ANEXO D). O mesmo aconteceu com a tensão superficial, que variou de 28,9 a 31,6 mN.m<sup>-1</sup>, entretanto, nas concentrações de 2,5; 5 e 10% não houve diferença significativa ao nível de significância de 95% (ANEXO D).

Concentrações de NaCl superiores a 10% (m/v) promoveram melhor estabilidade das emulsões formadas, sem apresentar diferença significativa entre as concentrações de 15 e 20% (m/v) de NaCl (ANEXO D). Pela teoria da difusão do íon, a energia interna do sistema aumenta quando a concentração de sal aumenta, através da fusão entre gotas de água para produzir gotas maiores e, como as emulsões não são termodinamicamente estáveis, a taxa de

coalescência aumenta causando a dispersão e, consequentemente a destruição das emulsões (CALDERON E POULIN, 1999; MOHAMED *et al.*, 2003).

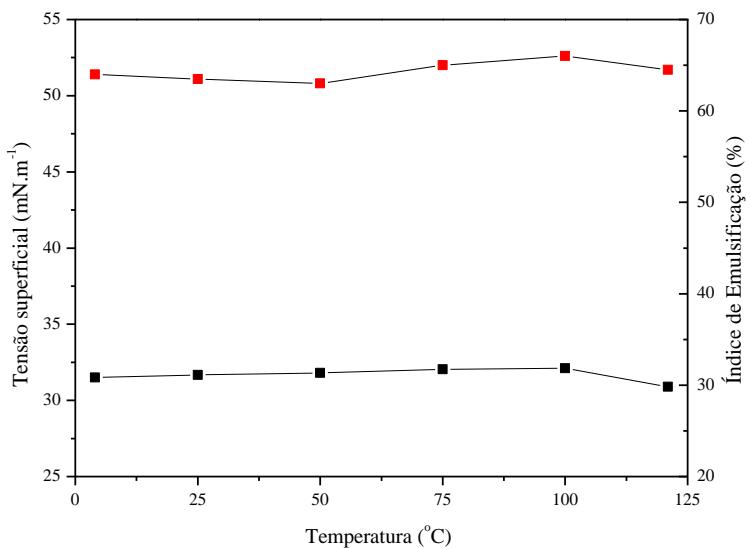
Os valores da tensão superficial também se modificaram com o aumento da concentração de NaCl, em concentração igual a 15% (m/v) a tensão encontrada foi igual a 36,5 mN.m<sup>-1</sup> e em concentração igual a 20% (m/v) de NaCl, o valor foi de 37 mN.m<sup>-1</sup>, porém não houve diferença significativa (ANEXO D). Segundo SHAW (1970) os sais iônicos formam interações íon-dipolo com a água, sendo essas interações mais fortes que as interações sal-fase gasosa, assim as moléculas desse soluto evitam a interface e aumentam a tensão superficial.

A estabilidade do biossurfactante em ambientes alcalinos e com alta salinidade, até 10% (m/v) de NaCl, confere a utilização deste em biorremediações de ambientes marinhos (KHOPADE *et al.*, 2011).

#### **4.4.3 Efeito da temperatura**

A fim de verificar o efeito da temperatura na estabilidade das emulsões e na tensão superficial, estudou-se o efeito da submissão da solução de biossurfactante a diferentes temperaturas por 30 minutos. As temperaturas avaliadas foram 4, 25, 50, 75, 100 e 121°C, temperaturas que vão desde a refrigeração a esterilização, conforme mostra a Figura 16.

**Figura 16** – Efeito da variação da temperatura no Índice de Emulsificação de emulsão formada com diesel (■) e na atividade superficial (■) do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em suco de caju. Barras de erro representam o desvio padrão.



Apesar da larga escala de temperatura usada neste trabalho, o efeito do tratamento térmico não demonstrou mudanças significativas na atividade tensoativa do biossurfactante nas variações de 4 a 100°C, o mesmo observado por estudos desenvolvidos por BARROS *et al.* (2008), que avaliou a exposição do biossurfactante a 100°C em diferentes períodos de tempo, e VAZ *et al.* (2012) que estudou o efeito da temperatura sobre o biossurfactante variando a temperatura de 20 a 46°C.

A tensão superficial foi alterada quando a solução do biossurfactante foi submetido à temperatura de 121°C, apresentando redução significativa (ANEXO E), onde seu valor diminuiu de 32,1 a 30,9 mN.m<sup>-1</sup>.

Quanto à estabilidade das emulsões, observou-se que mesmo havendo diferença significativa (ANEXO E), os valores de IE<sub>24</sub> apresentaram uma pequena variação média de 3% em todas as temperaturas testadas.

A partir dos dados obtidos indica-se a utilização do biossurfactante na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, já que o aquecimento para se atingir a esterilidade em produtos desses setores é de primordial importância (KHOPADE *et al.*, 2011).

#### 4.5 Diagramas de fases

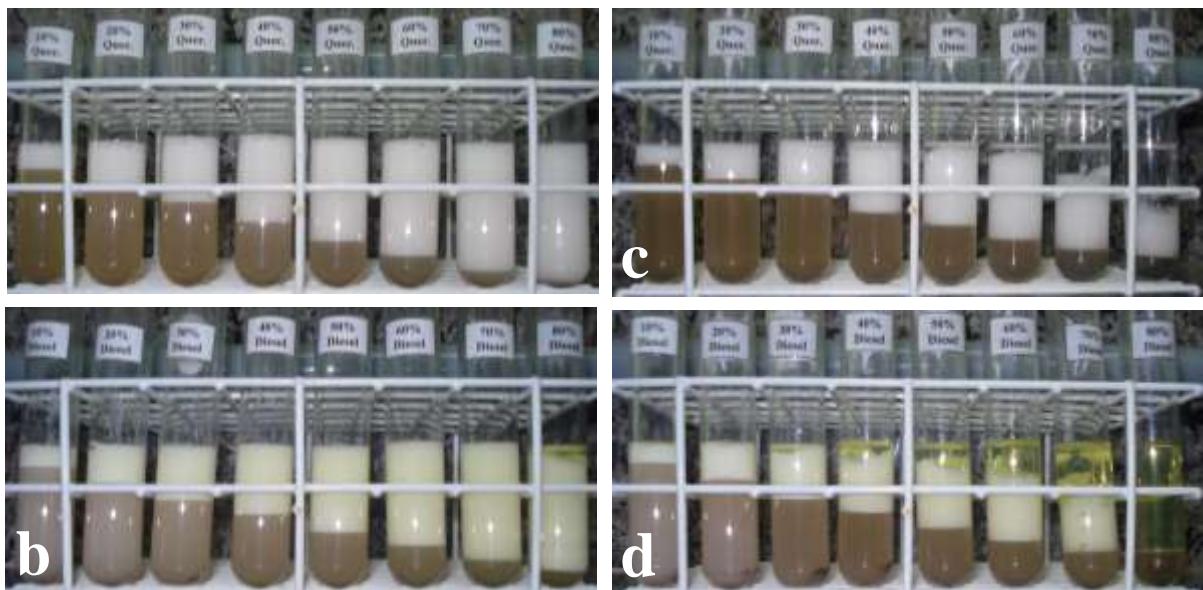
A construção de diagramas de fases é uma ferramenta fundamental na caracterização das condições experimentais para que as microemulsões existam e em quais proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes, onde a partir desses dados é possível a seleção da região do diagrama de fases que represente a condição desejável de aplicação (FORMARIZ, 2004; SOUSA, 2011). Assim, o comportamento de fases de sistemas emulsionados foi estudado.

A partir de resultados obtidos no índice de emulsificação, descrito no tópico 4.3, duas fontes hidrofóbicas que apresentaram emulsões bastante estáveis, foram selecionadas para a construção dos diagramas de fases, foram elas, querosene e diesel.

Em ambos os diagramas, a condição inicial foi a mesma, como mostrado na Figura 17 (a e b), apresentando fase aquosa em todas as composições A/O, exceto na concentração de 20% (v/v) de solução surfactante no diagrama com diesel, que apresentou-se em três fases (água, emulsão e óleo). Nas concentrações superiores a 50% (v/v) de solução de biossurfactante, observou-se excesso de fase aquosa.

A Figura 17 (c e d) mostra o resultado final da análise dos diagramas, onde observa-se que o comportamento da fase oleosa no diagrama com diesel foi mais expressivo que no diagrama com querosene, o que ocorreu devido o aumento da temperatura, pois o complexo da emulsão formada pelo biossurfactante e óleo foi quebrado, surgindo uma fase oleosa, o mesmo observado por SOUSA (2011), que produziu surfactina tendo como fonte de carbono a glicerina.

**Figura 17** – Ilustração da obtenção de dados para a construção dos diagramas de fases, com composições de 20 a 90% (v/v) de solução de biossurfactante. a. Condição inicial (surfactina – querosene); b. Condição inicial (surfactina – diesel); c. Condição final após ser submetido a 90°C (surfactina – querosene); d. Condição final após ser submetido a 90°C (surfactina – diesel).



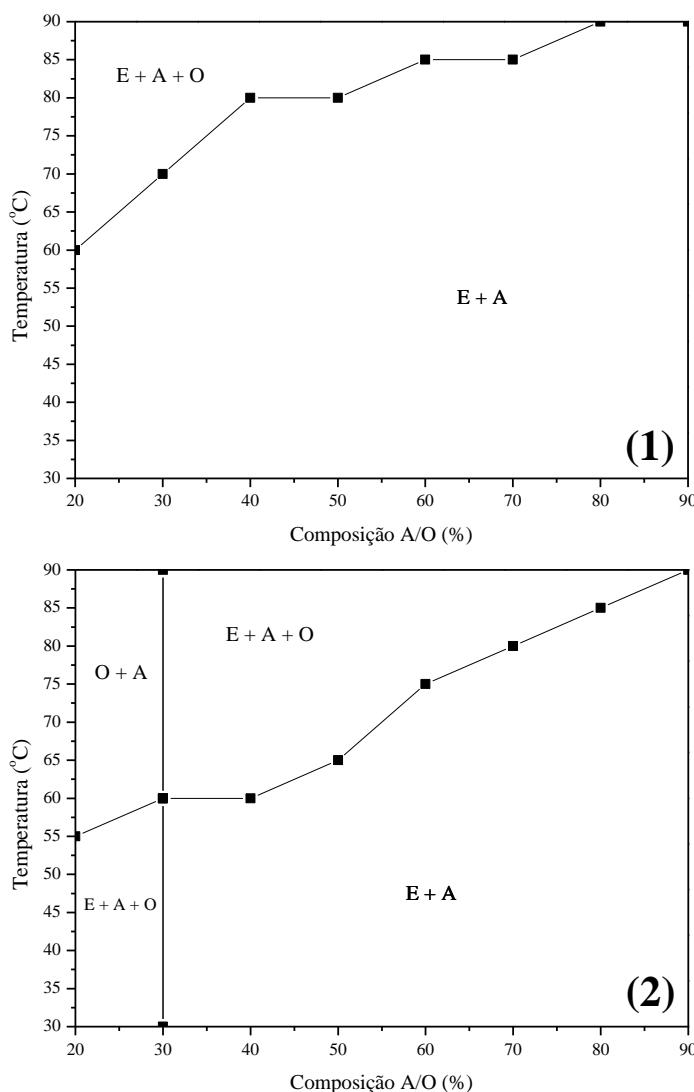
Na Figura 18, os diagramas binários apresentam os sistemas estudados, expondo as regiões de alteração de fases em função das diferentes estruturações de surfactina analisadas, observadas com o aumento gradual da temperatura. Segundo SOUSA (2011), como o aumento da temperatura ocorre de 5 em 5 °C, isso pode acarretar a transição de fase em temperatura intermediária, não sendo possível a visualização, devendo considerar a sensibilidade limitada do método. As áreas delimitadas pelas curvas denotam a região onde ocorre separação de fases.

No diagrama do sistema surfactina – querosene observou-se que quanto maior for a concentração de surfactante, maior deve ser a temperatura a qual este deve ser submetido para que haja a separação de fases. A mudança de fases, na concentração de 20% (v/v) de surfactina ocorreu a 60°C, já para que essa mudança fosse visualizada na solução de 30% (v/v) do biossurfactante, foram necessários 70°C. Nas concentrações de 40 e 50% (v/v), a temperatura teve que ser elevada à 80°C, já em 60 e 70% (v/v) de surfactina, a visualização da separação de fases foi possível a 85°C e, finalmente, nas concentrações iguais a 80 e 90% (v/v), a temperatura chegou a 90°C para que ocorresse a separação de fases.

No diagrama do sistema surfactina – diesel, na concentração de 20% (v/v) de surfactina, foi possível visualizar a quebra total da emulsão formada, voltando à condição

inicial antes da agitação, óleo + solução de biosurfactante. Nas concentrações posteriores, a cada 10% (v/v) que eram aumentados na relação da concentração de surfactina, eram necessários 5°C a mais para que fosse possível a visualização da separação de fases. Entretanto, a concentração de 90% (v/v), apresentou comportamento similar ao sistema surfactina – querosene, não ocorrendo a separação de fases.

**Figura 18** – Diagramas de fases para o sistema de composição A/O em função da temperatura. (1) Querosene; (2) Diesel. E - fase emulsionada; A - fase aquosa; O - fase óleo.



Com a construção dos diagramas observou-se a possibilidade de utilização do biosurfactante produzido em diversos setores industriais, já que o produto de interesse foi capaz de formar emulsões estáveis em variadas e elevadas temperaturas (SOUSA, 2011).

O sistema surfactina – querosene pode ser aplicado em fluidos de corte, essenciais na produção de peças metálicas, trazendo vantagens a esse processo como, biodegradação do efluente gerado e redução no custo, já que os fluidos de corte são responsáveis por grande parte do custo final do processo (SOUZA, 2011).

O sistema surfactina – diesel evidencia a utilização do biossurfactante produzido no setor de tratamento de resíduos e na biorremediação, já que, segundo Rocha (2007), a aplicação do biossurfactante aumenta a degradação destes compostos no ambiente, pois possui a capacidade de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água.

## 4.6 Bioensaios toxicológicos

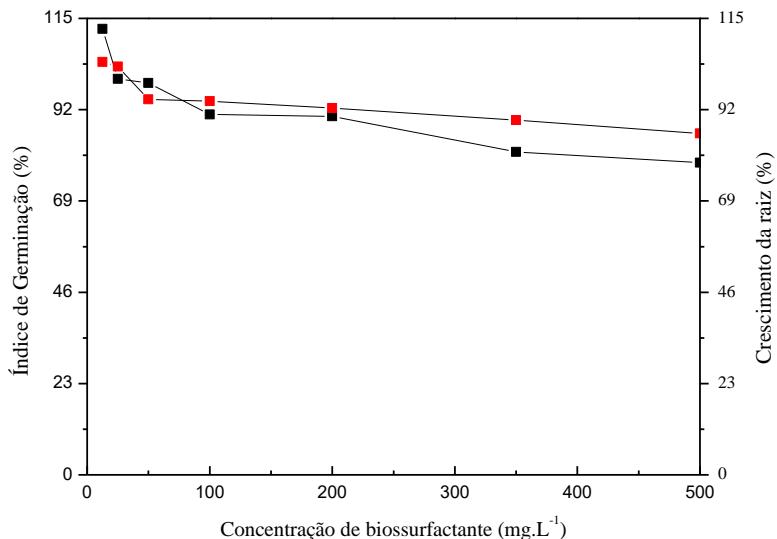
### 4.6.1 Teste de germinação com *Lactuca sativa*

Os problemas de toxicidade em uma planta surgem quando íons tóxicos, em altas concentrações, são absorvidos e acumulados em suas células provocando danos irreversíveis (AYERS e WESTCOT, 1999).

No presente trabalho, explorou-se a toxicidade do biossurfactante produzido frente à sementes de *Lactuca sativa* (alface), já que poucos estudos foram realizados a fim de determinar a que concentração limite pode se dar o uso desses compostos em aplicações ambientais (FARIA, 2010).

A Figura 19 demonstra o ensaio com sementes de *Lactuca sativa* (alface), no qual se leva em consideração não só o crescimento das raízes como o número de sementes germinadas.

**Figura 19** – Índice de Germinação (■) e crescimento das raízes (■) da espécie *Lactuca sativa* em diferentes concentrações do biossurfactante produzido por LAMI005 em suco de caju. Barras de erro representam o desvio padrão.



Considerando que um IG de 80% tem sido utilizado como um indicador de desaparecimento de fitotoxicidade (TIQUIA *et al.*, 1996), os resultados obtidos indicam que as soluções testadas até a concentração de 350 mg.L<sup>-1</sup>, não mostraram efeitos inibitórios sobre a germinação das sementes e alongamento da raiz da alface, uma vez que IG de 112,3; 99,8; 98,7; 90,7; 90,3 e 81,3% foram encontrados para as soluções de biossurfactante de 12,5; 25; 50; 100 e 350 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Apenas a solução na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> apresentou valor de germinação inferior a 80%, igual a 78,6%. Assim, pode-se afirmar que o biossurfactante produzido não apresentou influência no alongamento das raízes e no índice de germinação das sementes de alface *Lactuca sativa*.

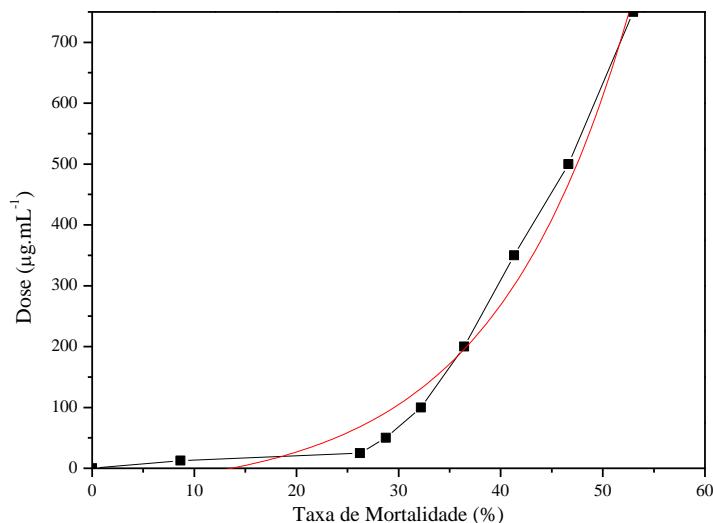
#### 4.6.2 Teste de mortalidade do microcrustáceo da espécie *Artemia salina*

A utilização de biossurfactantes em recuperação melhorada do petróleo e biorremediação vêm crescendo mundialmente, isso se deve ao fato estes serem altamente biodegradáveis e com baixa toxicidade (DESAI e BANAT, 1997; RAHMAN e GAKPE , 2008; MUTHUSAMY *et al.*, 2008). Assim, o teste de ecotoxicidade sob o microcrustáceo

*Artemia salina* foi realizado visando um maior entendimento sobre a toxicidade desses compostos em organismos aquáticos, no caso de possíveis aplicações ambientais. O extrato purificado foi avaliado nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 350 e 500 mg.L<sup>-1</sup>. A *Artemia salina* é um organismo-padrão em testes de ecotoxicologia, fácil de ser comprado em lojas para aquários, fácil de ser mantido em laboratório pois possui um ciclo de vida curto, requer baixos volumes de amostra, além de serem organismos bem relatados na literatura para testes de toxicologia ambiental (NUNES *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2009).

Para explicitar os resultados encontrados neste ecoensaio, faz-se necessário o cálculo da CL<sub>50</sub> pela regressão não linear entre o aumento da concentração do extrato aquoso de surfactina *versus* a porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas (Figura 20).

**Figura 20** – Taxa de mortalidade da espécie *Artemia salina* em diferentes concentrações do biosurfactante produzido por LAMI005.



A partir da regressão não linear foram obtidas a Equação 5 e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,95, a partir dos quais a CL<sub>50</sub> foi calculada.

$$y = -44,24736 + \left( 9,94079 \cdot e^{\left( \frac{x-183502}{1848712} \right)} \right) + \left( 9,94078 \cdot e^{\left( \frac{x-183502}{1848622} \right)} \right) \quad (5)$$

De acordo com PEREIRA e CASTRO (2007), uma substância é considerada tóxica quando a CL<sub>50</sub> for menor que 80 µg.mL<sup>-1</sup>, moderadamente tóxica, quando os valores são entre 80 e 250 µg.mL<sup>-1</sup>. A CL<sub>50</sub>, calculada a partir da Equação 5, foi encontrada na concentração de

612,27 µg.mL<sup>-1</sup>, não apresentando efeitos tóxicos sob o organismo estudado. Observou-se que nas concentrações de 12,5 e 25 µg.mL<sup>-1</sup>, a porcentagem de imobilidade apresentou aumentos significativos, porém em concentrações igual e/ou superiores a 50 µg.mL<sup>-1</sup> a porcentagem de imobilização aumentou gradativamente. Contudo, a toxicidade de uma substância depende de sua natureza, pH, temperatura, salinidade, organismo-teste, concentração e condições impostas para o teste (KOZLOVA *et al.*, 2004).

A baixa toxicidade dos biossurfactantes é explicada por suas propriedades tensoativas suaves com elevada compatibilidade com as membranas biológicas, devido sua estrutura polimérica e seu conteúdo de grupos polifuncionais, que dão origem a micelas com menor carga eletrostática (AL-TAHHAN *et al.*, 2000; NITSCHKE e PASTORE, 2002; HUA *et al.*, 2003).

#### **4.7 Aplicação do biossurfactante na remoção de hidrocarbonetos contaminantes de areia**

Os acidentes com derramamento de óleo se tornam cada vez mais comuns e isso tem causado muitos problemas ao meio ambiente e à sociedade e, como técnica promissora na remoção e recuperação de uma significativa quantidade do óleo residual tem-se a aplicação de biossurfactantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002; APARNA, *et al.*, 2012).

A formação de micelas aumenta a solubilidade do contaminante a partir da formação de uma emulsão estável, o que promove a remoção do óleo das partículas do solo (BANAT, 1995; HAIGH, 1996; CONTE *et al.* 2005), sabendo que a formação de micelas só ocorre em valores iguais ou superiores a CMC, foram utilizadas concentrações de 12,5 mg.L<sup>-1</sup> (igual a CMC) e 37,5 mg.L<sup>-1</sup> (3 vezes superior a CMC). Dessa forma, observou-se que com o aumento na concentração de surfactina ocorreu uma maior remoção do óleo do solo, como demonstrado na Tabela 1, o biossurfactante semi-purificado apresentou potencial aplicabilidade na biorremediação, demonstrado pela remoção de 78,5 e 81,8% do diesel adsorvido na areia quando foram utilizadas concentrações de solução de surfactina iguais a 12,5 e 37,5 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que o controle, com água destilada, removeu 37,9% do óleo contaminante. O potencial também foi evidenciado ao promover a dessorção de 65,4 e 77,8% do petróleo adsorvido na areia ao utilizar solução de biossurfactante nas

concentrações de 12,5 mg.L<sup>-1</sup> (CMC) e 37,5 mg.L<sup>-1</sup> (3CMC), respectivamente, e o controle, com água destilada, foi capaz de remover 45,6% da fonte hidrofóbica.

**Tabela 1** – Remoção de hidrocarbonetos de areia contaminada.

Tratamento	Diesel removido (%)	Petróleo removido (%)
Solução surfactina 12,5 mg.L <sup>-1</sup> (CMC)	78,5 ± 0,5	65,4 ± 0,8
Solução surfactina 37,5 mg.L <sup>-1</sup> (3CMC)	81,8 ± 0,2	77,8 ± 0,7
Água destilada (controle)	37,9 ± 0,5	45,6 ± 0,4

Em estudos realizados por APARNA *et al.* (2012), o biosurfactante produzido por *Pseudomonas sp.* reduziu o petróleo residual na areia em 89,7% na concentração de 0,01% (m/v) e por LAI *et al.* (2009) reduziram em 62% o TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) do solo contaminado ao utilizar surfactina 0,2% (m/v). Estudos de CONTE *et al.*, (2005) utilizando os surfactantes químicos dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 apresentaram uma eficiência de remoção de hidrocarbonetos aromáticos do solo em um sistema de lavagem do solo, quando comparados com a remoção pela água, de aproximadamente 80%. Entretanto, a vantagem na utilização de biosurfactantes se dá pelo fato destes serem biodegradáveis e de baixa toxicidade quando comparados aos surfactantes químicos (COSTA *et al.*, 2006).

## 5 – CONCLUSÕES

Neste estudo foram aplicadas metodologias para a caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido a partir de um co-produto da indústria de caju, suco de caju, agregando-se valor ao processo, uma vez que a fonte utilizada é disponível e de baixo custo. Estudaram-se as melhores condições de aplicação, sendo os resultados obtidos bem satisfatórios, como os citados a seguir.

A partir dos espectros obtidos, bandas características da molécula de surfactina foram observadas, indicando que o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* é um lipopeptídeo cíclico compatível com a surfactina padrão (Sigma) apresentando um grupamento metilênico a mais na cadeia alifática.

Observou-se que o lipopeptídeo produzido pela bactéria *Bacillus subtilis* LAMI005 representa um tipo de biossurfactante com atividade superficial altamente estável apresentando CMC igual a  $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e reduzindo a tensão superficial da água de 72 para  $31,8 \text{ mN.m}^{-1}$  e a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de 27 para  $2 \text{ mN.m}^{-1}$ .

A habilidade de emulsificação a altas temperaturas, pHs ácidos e básicos e diferentes concentrações de NaCl também foi demonstrada ao apresentar-se estável em valores de pH entre 6 e 8, em concentrações de NaCl de até 10% (m/v) e em temperaturas de até 121°C.

A construção dos dois diagramas de fases mostrou a possibilidade de aplicações do biossurfactante analisado em diversos setores industriais, como biorremediação, tratamento de resíduos e fluidos de corte, simulando os comportamentos dinâmicos da produção de biossurfactantes.

Quanto à toxicidade, o estudo realizado confirmou o relatado por diversos autores na literatura, baixa toxicidade da surfactina. O biossurfactante apresentou-se atóxico para a *Artemia salina*, apresentando na CL<sub>50</sub> valor de  $612,27 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  e baixa toxicidade para o alface da espécie *Lactuca sativa*, com IG superior a 80% em concentrações inferiores ou igual a  $350 \text{ mg.L}^{-1}$ .

O biossurfactante produzido mostrou-se ecoeficiente frente à remoção de hidrocarbonetos adsorvidos em areia, evidenciando a aplicação do presente biossurfactante em biorremediação.

## REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCIA, F. & MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367–1371, 2001.
- AL-BAHRY Y. M.; AL-WAHABI, A. E.; ELSHAFIE, A. S.; AL-BEMANI, S. J.; JOSHI, H. S.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 1-6, 2012.
- AL-TAHHAN, R. A.; SANDRIN, T. R.; BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3262–3268, 2000.
- ANTUNES, M. S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas utilizadas em misturas 3 em 1. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2007.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.
- ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J. Trehalose-containing glycolipids. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, v. 16, p. 59-99, 1978.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, Estudos FAO Irrigação e Drenagem, n. 29 revisado, p. 218, 1999.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23-29, 2012.
- BANAT, I. M. Biosurfactants, more in demand than ever. **Biofutur**, v. 198, n. 20, p. 44-47, 2000.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 591-594, 1993.

BANAT, I. M. Biosurfactant Production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995a.

BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal: state of the art (review). **Acta Biotecnologica**, v. 15, n. 3, p. 251-267, 1995b.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants: production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

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

BANAT, I.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANNERJEE S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 80-88, 1991.

BARRETO, R. V. G. **Prospecção ambiental de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de bioativos**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

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

BARROS, F. F. C; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. t. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BODOUR, A.A., GUERRERO-BARAJAS, C., JIORLE, B.V., MALCOMSON, M.E., PAULL, A.K., SOMOGYI, A., TRINH, L.N., BATES, R.B. & MAIER, R.M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 114-120, 2004.

- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BOSCH, M. P. Surface active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 25, p. 208-211, 1988.
- BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 13, p. 61-64, 1991.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.
- CALDERON, F.; POULIN, P. Progress in understanding emulsion metastability and surface forces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, p. 223-230, 1999.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- 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.
- CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The Mannoprotein of the *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1420-1425, 1988.
- CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 113-117, 2002.
- CARRILLO, C.; TERUEL, J.; ARANDA, F.; ORTIZ, A. Molecular Mechanism of Membrane Permeabilization by the Peptide Antibiotic Surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1611, p. 91-97, 2003.
- CHEN, H.; JUANG, R. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 39-46, 2008.

CHEN, J.; SONG, X.; ZHANG, H.; QU, Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 501-506, 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.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846-850, 1985.

CONTE, P.; AGRETTI, A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 135, n. 3, p. 515-522, 2005.

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

COOPER, D. G.; MacDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.

COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E. Surface active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.26, p.229-253, 1980.

CORRER, C. J.; MAZZOCHIN, L. F.; LOBO, I.; SAAB, O.J.G.A.; GUEDES, C.L.B. Aplicação “in situ” de surfactantes em solo contaminado com petróleo e tratamento da água residual com agente oxidante. **Anais do 4º PDPETRO**, Campinas, SP, 21-24 de Outubro de 2007.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado

em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 4830–488, 2006.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil sample. **Applied Microbial Biotechnology**, v.69, p. 192-199, 2005.

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DI GIOIA, D.; FAMBRINI, L.; COPPINI, E.; FAVA, F.; BARBERIO, C. Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 761–769, 2004.

EDWARDS, K. R.; LEPO, J. E.; LEWIS, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1309-1316, 2003.

FARIA, A. F. **Produção, purificação e caracterização química de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. 2010. 173 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FERNANDES, P. V.; ARRUDA, I. R.; SANTOS, A.; ARAÚJO, A.; MAIOR, A.; XIMENES, E. Antimicrobial Activity of Surfactants Produced by *Bacillus subtilis* R14 Against Multidrug-Resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709, 2007.

FERRAREZZO, E. M. 1998. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão. Dissertação

de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B. J.; JÚNIOR-SILVA, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 44-57, 2004.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, n. 3, p. 235–240, 2000.

FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; GIOVANNA MARTINOTTI; M., BANAT, I.M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – present status and future potentials, biomedical Science. **Engineering and Technology**, p. 325-370, 2012.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

GOBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 4, p. 225-230, 1984.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; TULLOCH, A. P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Society for Chemistry**, v. 39, p. 846-855, 1961.

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

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

HOMME, R. K.; HUSE, K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 8, p. 853-858, 1993.

HOMMEL, R. K.; STUWER, O.; STUBER, W.; HAVERBURG, D.; KLEBER, H. P. Production of water soluble surface-active exolipids by *Torulopsis bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 199-205, 1987.

HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, v. 49, p. 186-191, 2004.

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, v. 37, n. 17, p. 4143-4150, 2003.

HUSSAIN, A.; ARNOLD, J.; KHAN, M.; AHSAN, F. Absorption Enhancers in Pulmonary Peptide Delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 94, n. 1, p. 15-24, 2004.

ITOKAWA, H.; MIYASHITA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; HIRANO, T.; HOMMA, M.; OKA, K. Structural and conformational studies of [Ile<sup>7</sup>] and [Leu<sup>7</sup>]Surfactins from *Bacillus subtilis natto*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 604-607, 1994.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 220-222, 2006.

JAIN, R. M.; MODY, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1110-1116, 2012.

KACHHOL, T.; SCHLINGMANN, M. Possible food and Agricultural Applications of Microbial Surfactants: An Assessment. In N. Kosaric, W.L. Carns, & N.C.C Gray (Eds). **Biosurfactants and Biotechnology**, New York: Marcel Dekker, p. 183-210, 1987.  
KAPPELI, O. & FINNERTY, W.R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 707-712, 1979.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C.

Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318, 2011.

KIM, K.; JUNG, S.; LEE, D.; JUNG, J.-K.; PARK, J.; KIM, D.; LEE, C.-H. Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A2. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 975-985, 1998.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS Letters**, v. 231, n. 1, p. 107–110, 1988.

KOZLOVA, E. V.; PUNTUS, I. F.; SLEPENKIN, A. V; BORONIN, A. M. Naphthalene degradation by *Pseudomonas putida* strains in soil model systems with arsenite. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1305–1308, 2004.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; NICK CHRISTOFI; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.

LAI, C.; HUANG, Y.; WEI, Y.; CHANG, J. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 609-614, 2009.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12–20, 2002.

LEE, S.C.; LEE, S.J.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.Y.; CHOI, Y.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. **Bioresource Technology**, v.99, n. 7, p.2288-2292, 2008.

LIMA, C. J. B. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas auruginosa* empregando óleo de soja residual**. 2007. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenentreno e cádmio de solo. 2008. 170 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

LIN, S. Biosurfactants: Recents Advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LIM, J.-H.; PARK, B.-K.; KIM, M.-S.; HWANG, M.-H.; RHEE, M.-H.; PARK, S.-C.; YUN, H.-I. The Anti-Thrombotic Activity of Surfactins. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, p. 353-355, 2005.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvical and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MAKKAR, S. R.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of Molasses for Biosurfactant Production by Two *Bacillus* Strains at the Thermophilic Conditions. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 74, p. 887-889, 1997.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 2, p. 237-241, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R. S.; ROCKNE, K. J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2280-2292, 2003.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 675-683, 2005.

MANEERAT, S.; PHETRONG, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactants. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 29, n. 3, p.781-791, 2007.

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

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MEDEIROS, S. I. G. **Síntese enzimática de biossurfactante e sua aplicabilidade na indústria do petróleo**. 2007. 138 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2007.

MIRELES, J.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5848-5854, 2001.

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 158 p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil). – Programa de Engenharia Civil, COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MIHELCIC, J. R.; LUEKING, D. R.; MITZELL, R. J.; STAPLETON, J. M. Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. **Biodegradation**, v. 4, p. 141–153, 1993.

MOHAMED, A. M. O.; EL GAMAL, M.; ZEKRI, A. Y. Effect of salinity and temperature on water cut determination in oil reservoirs. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 40, p. 177-188, 2003.

MORAES, S.L.; REZENDE, M.O.O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Química Nova**, v.27, n. 5, p.701-

705, 2004.

MORAIS, R. K. S. **Produção de biosurfactante a partir de substratos de baixo custo.** 2012. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia, Maceió, 2012.

MORÁN, A. C.; OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, v. 1, p. 65–71, 2000.

MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.; RÜTTINGER, H. H. Determination of critical micelle concentration and interactions between cephalosporins and charged surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 868, n. 2, p. 317-319, 2000.

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

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 3016-3019, 1989.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In **Biosurfactants, Production, Properties and Applications**. New York. Editora: N. Kosaric, 1993. cap.13, p. 329-372.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 23–29, 1990.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. Fatores externos ambientais que influenciam na germinação de sementes. In: **Informativo Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, São Paulo, São Paulo, 1998.

NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato.** 2004. 88 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; COSTA, G.N.; GILIOLI, R.; MEURER, E.C.; GATTI, M.S.V.; EBERLIN, M.N.; HÖEHR, N.F.; PASTORE, G.M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-596, 2004.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

OLIVEIRA, D. W. F. **Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado.** 2010. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2010.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34-43, 2013.

OU, Z. **Separate and combined environmental behaviour of surfactants and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's).** 2000. 256 f.Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Naturais) – Institute of Ecological Chemistry, Technical University of Munich, Neuherberg, Germany, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; RUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.

PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E. Analytical applications of organized molecular assemblies. **Analytica Chimica Acta**, v. 169, p. 1-29, 1985.

PEREIRA, A. C.; CASTRO, D. L. Prospeção fitoquímica e potencial citotóxico de *Unxia kubitzkii* H. Rob.(Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p.

231-233, 2007.

PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Structure de la mycosubtiline, antibiotique isolé de *Bacillus subtilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 63, p. 391-398, 1976.

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

PEYPOUX, F.; POMMIER, M. T.; DAS, B. C.; BESSON, F.; DELCAMBE, L.; MICHEL, G. Structures of Bacillomycin D and Bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v. 77, n. 12, p. 1600-1604, 1984.

PILJAC, T. E PILJAC, G. **Use of Rhamnolipids in Wound Healing, Treating Burn Shock, Atherosclerosis, Organ Transplants, Depression, Schizophrenia, and Cosmetics**. European Patent, n. 1889623. New York, 1999.

POREMBA, K.; GUNKEL, W.; LANG, S.; WAGNER, F. Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. **Zeitschrift für Naturforschung**, p. 46, p. 210–216, 1991.

RAHMAN, P.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants - Review. **Biotechnology**, v. 7, p. 360-370, 2008.

REILING, H.E., THANEI-WYSS, U., GUERRA-SANTOS, L.H., HIRT, R. KÄPPELI, O. & FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 51, p. 985-989, 1986.

REISER, J.; KOCH, A. K.; JENNY, K.; KÄPPELI, O. **Advances in Applied Biotechnology Series**, 1989.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 518-521, 2009.

ROCHA, M. V. R. **Produção de biosurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. 2007, 144 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2007.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. In: **4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**, Campinas, São Paulo. 2007.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 609-618, 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSEN, M. J. **Surfactants and interface phenomena**. New Jersey, Ed. John Wiley & Sons, 2ª Edição, 2004.

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

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

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA JR. N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p. 459-467, 2002.

SCHIPPERS, C.; GEBNER, K.; MÜLLER, T.; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 189-198, 2000.

SCHOLZ, C.; MEHTA, S.; BISHT, K.; GUILMANOV, V.; KAPLAN, D.; NICOLOSI, R.; GROSS, R. Bioactivity of extracellular glycolipids: Investigation of potential anti-cancer activity of sophorolipids and sophorolipid derivatives. **Proc. Am. Chem. Soc. Polym. Preprints**, v. 39, p. 168-169, 1998.

- SEN, R. & SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.
- SEN, R. & SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 141-148, 2004.
- SEPAHY., A. A.; ASSADI, M. M.; SAGGADIAN, V.; NOOHI, A. Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. **International Journal of Environmental Sciencie & Technology**, v. 1, n. 4, p. 287-293, 2005.
- SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of Surfactin Chemical Properties and the Potential Biomedical Applications. **Cent. Eur. J. Med**, v. 3, p. 123-133, 2008.
- SHABTAI, Y. & GUTNIK, D.L. Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 146-151, 1986.
- SHAH, V.; DONCEL, G. F.; SEYOUM, T.; EATON, K. M.; ZALENSKAYA, I.; HAGVER, R.; AZIM, A.; GROSS, R. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4093-4100, 2005.
- SHAH, V.; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of Restaurant Waste Oil as a Precursor for Sophorolipid Production. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 512-515, 2007.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel Bioemulsifiers from Microorganisms for Use in Foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.
- SHAW, D. J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. Editora Edgard Blucher Ltda. 181p, 1970.
- SILVA, S. N. R. L.; FARIA, 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, n. 1, p. 174-183, 2010.
- SIQUEIRA, M. J.; BOMM, D. M.; PEREIRA, G. F. N.; GARCEZ S. W.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, p. 557-559, 1998.

SOUSA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; ALMEIDA, J. G. L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O. D. L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1831-1839, 2011.

SOUSA, M. **Bioconversão do glicerol para produção de biosurfactantes: aplicação no preparo de emulsões**. 2011. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2011.

SOUSA, M.; MELO V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant – producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p.897-906, 2012.

TENDULKAR, S. R.; SAIKUMARI, Y.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; BALARAM, P.; CHATTOO, B. Isolation, Purification and Characterization of an Antifungal Molecule Produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its Effect on Phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2331-2339, 2007.

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y.; HODGKISS, I. J. Microbial activities during composting of spent pig manure sawdust litter at different moisture contents. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 201-206, 1996.

TULOCH, A. P.; HILL, A.; SPENCER, J. F. T. Structure and relations of lactonic and acidic sophorosides of 17-hydroxyoctadecanoic acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 46, p. 3337-3351, 1968.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S. Matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

VAN BEELEN, P.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediments. **Chemosphere**, v. 34, n. 3, p. 455-499, 1997.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

VAN HAMME, J.D.; URBAN J. Biosurfactants in bioremediation. **Advances in Applied Bioremediation**, Soil Biology, v.17, p.73-89, 2009.

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.

VELIKONJA, N.; KOSARIC, N. Biosurfactants: production, properties, applications; Kosaric, N., Ed.; Marcel Decker: New York, 1993, cap. 16.

VIRAMONTES-RAMOS, S.; PORTILLO-RUIZ, M. C.; BALLINAS-CASARRUBIAS, M. L.; TORRES-MUÑOZ, J. V.; RIVERA-CHAVIRA, B. E; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 668-675, 2010.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M. Antimycoplasma Properties and Applications in Cell Cultura of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63 p. 44-49, 1997.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G.; RULKENS, W. H. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 16, p. 1699-1705, 1995.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH – contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415 – 423, 1997.

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, n. 4, p.1329-1334, 2005.

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Antimicrobial Activities of Some *Bacillus spp.* Strains Isolated from the Soil. **Microbiological Research**, v. 161, p. 127-131, 2006.

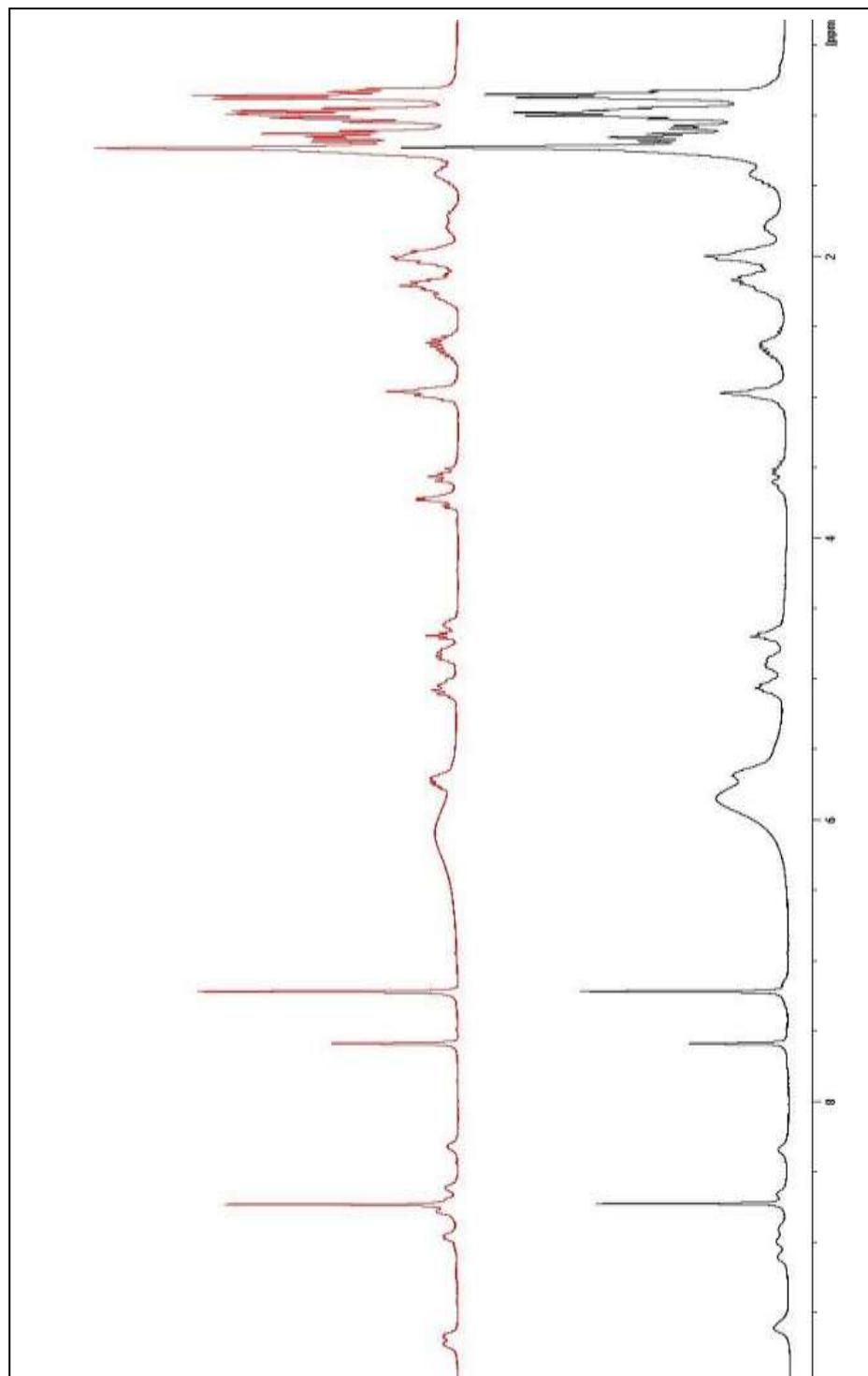
YOUSSELF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detected biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZHANG, Y.; MAIER, R. M. Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3276-3282, 1992.

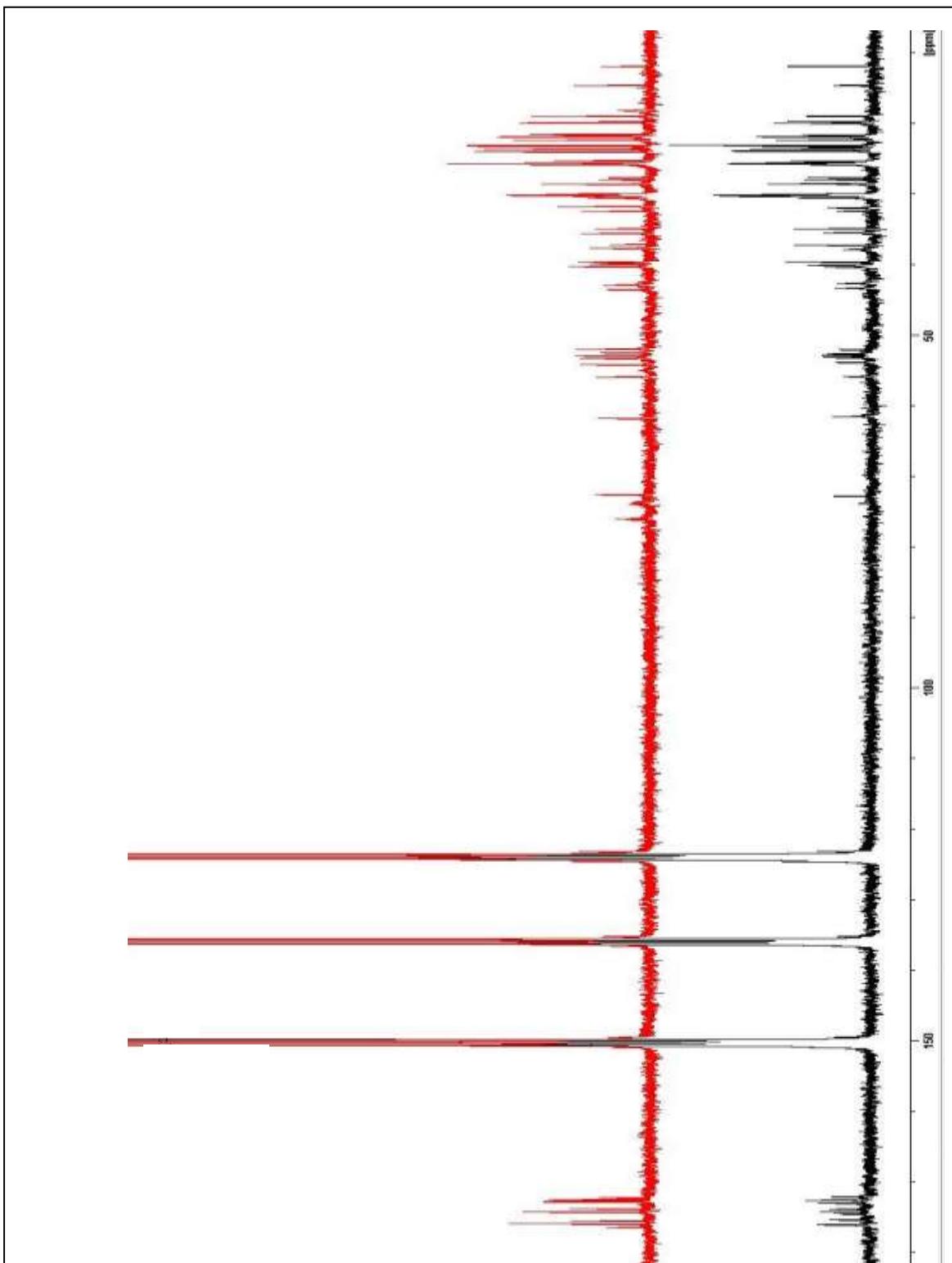
## ANEXO A

### Dados Comparativos

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração F:29-35 (---) e espectro de RMN  $^1\text{H}$  da surfactina padrão da Sigma (—) (300 MHz, piridina-*d*5)



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração F:29-35 (---) e espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da surfactina padrão da Sigma (—) (75 MHz, piridina-*d*5).



## ANEXO B

### Análises Estatísticas

Análise estatística para avaliação da estabilidade de emulsão formada com diferentes hidrocarbonetos

- Gasolina

**ANOVA OneWay (16/07/2012 22:15:57)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
1 hora	3	68,67424	8,03057	4,63645
24 horas	3	55,24138	3,20597	1,85097
48 horas	3	53,90805	2,13941	1,23519
72 horas	3	52,57471	1,24202	0,71708
96 horas	3	51,42529	2,90502	1,67722
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	592,75096	148,18774	8,29466	0,00323
Error	10	178,65439	17,86544		
Total	14	771,40535			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,7684	0,07499	4,22675	56,36473
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
24 Horas 1 Hora	-13,43286	3,45113	-3,89231	0,02998	0,05	1	-25,79274	-1,07299
48 Horas 1 Hora	-14,7662	3,45113	-4,27866	0,01615	0,05	1	-27,12607	-2,40632
48 Horas 24 Horas	-1,33333	3,45113	-0,38635	1	0,05	0	-13,69321	11,02654
72 Horas 1 Hora	-16,09953	3,45113	-4,665	0,00888	0,05	1	-28,4594	-3,73966
72 Horas 24 Horas	-2,66667	3,45113	-0,77269	1	0,05	0	-15,02654	9,69321
72 Horas 48 Horas	-1,33333	3,45113	-0,38635	1	0,05	0	-13,69321	11,02654
96 Horas 1 Hora	-17,24896	3,45113	-4,99806	0,00539	0,05	1	-29,60883	-4,88908
96 Horas 24 Horas	-3,81609	3,45113	-1,10575	1	0,05	0	-16,17597	8,54378
96 Horas 48 Horas	-2,48276	3,45113	-0,71941	1	0,05	0	-14,84263	9,87711
96 Horas 72 Horas	-1,14943	3,45113	-0,33306	1	0,05	0	-13,5093	11,21045

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	35,8474	8,96185	1,6886	0,22843
Error	10	53,0726	5,30726		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

- Diesel

**ANOVAOneWay (16/07/2012 22:20:54)**

- Notes
- Input Data
- Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
1 hora	3	87,52381	4,69766	2,71219
24 horas	3	67,52137	1,48038	0,8547
48 horas	3	66,96581	2,13119	1,23044
72 horas	3	66,96581	2,13119	1,23044
96 horas	3	66,32479	1,19123	0,68776

- One Way ANOVA
- Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	1018,57775	254,64444	36,62631	6,04984E-6
Error	10	69,525	6,9525		
Total	14	1088,10275			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

- Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,9361	0,03711	2,63676	71,06032

- Means Comparisons
- Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
24 Horas 1 Hora	-20,00244	2,1529	-9,29091	3,1059E-5	0,05	1	-27,71285	-12,29203
48 Horas 1 Hora	-20,558	2,1529	-9,54896	2,42255E-5	0,05	1	-28,26841	-12,84758
48 Horas 24 Horas	-0,55556	2,1529	-0,25805	1	0,05	0	-8,26597	7,15486
72 Horas 1 Hora	-20,558	2,1529	-9,54896	2,42255E-5	0,05	1	-28,26841	-12,84758
72 Horas 24 Horas	-0,55556	2,1529	-0,25805	1	0,05	0	-8,26597	7,15486
72 Horas 48 Horas	0	2,1529	0	1	0,05	0	-7,71041	7,71041
96 Horas 1 Hora	-21,19902	2,1529	-9,84671	1,831E-5	0,05	1	-28,90944	-13,48861
96 Horas 24 Horas	-1,19658	2,1529	-0,5558	1	0,05	0	-8,907	6,51383
96 Horas 48 Horas	-0,64103	2,1529	-0,29775	1	0,05	0	-8,35144	7,06939
96 Horas 72 Horas	-0,64103	2,1529	-0,29775	1	0,05	0	-8,35144	7,06939

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Homogeneity of Variance Test
- Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	13,48378	3,37094	2,88537	0,07931
Error	10	11,6829	1,16829		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

- Querosene

**ANOVAOneWay (16/07/2012 12:16:24)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
1 hora	3	70	0	0
24 horas	3	66,11111	0,96225	0,55556
48 horas	3	65	1,66667	0,96225
72 horas	3	64,44444	0,96225	0,55556
96 horas	3	63,88889	0,96225	0,55556
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	71,48152	17,87038	16,08328	2,34747E-4
Error	10	11,11116	1,11112		
Total	14	82,59268			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,86547	0,016	1,05409	65,88889
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
24 Horas 1 Hora	-3,88889	0,86066	-4,51847	0,01111	0,05	1	-6,97127	-0,8065
48 Horas 1 Hora	-5	0,86066	-5,80946	0,00171	0,05	1	-8,08238	-1,91762
48 Horas 24 Horas	-1,11111	0,86066	-1,29099	1	0,05	0	-4,1935	1,97127
72 Horas 1 Hora	-5,55556	0,86066	-6,45496	7,30157E-4	0,05	1	-8,63794	-2,47317
72 Horas 24 Horas	-1,66667	0,86066	-1,93649	0,81554	0,05	0	-4,74905	1,41571
72 Horas 48 Horas	-0,55556	0,86066	-0,6455	1	0,05	0	-3,63794	2,52683
96 Horas 1 Hora	-6,11111	0,86066	-7,10046	3,29358E-4	0,05	1	-9,1935	-3,02873
96 Horas 24 Horas	-2,22223	0,86066	-2,58199	0,27323	0,05	0	-5,30461	0,86016
96 Horas 48 Horas	-1,11111	0,86066	-1,29099	1	0,05	0	-4,1935	1,97127
96 Horas 72 Horas	-0,55556	0,86066	-0,6455	1	0,05	0	-3,63794	2,52683

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
  - Homogeneity of Variance Test**
    - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	1,97532	0,49383	2	0,17053
Error	10	2,46915	0,24691		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

- N-Hexadecano

**ANOVA One Way (16/07/2012 12:27:36)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
1 hora	3	70,76923	2,03519	1,17502
24 horas	3	68,56764	1,14857	0,66313
48 horas	3	64,2794	1,91429	1,10522
72 horas	3	64,2794	1,91429	1,10522
96 horas	3	60,1901	7,39452	4,26923
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	204,84397	51,21099	3,79514	0,03965
Error	10	134,93834	13,49383		
Total	14	339,78231			

**Null Hypothesis:** The means of all levels are equal  
**Alternative Hypothesis:** The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,60287	0,05598	3,6734	65,61716
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
24 Horas 1 Hora	-2,20159	2,99931	-0,73403	1	0,05	0	-12,94334	8,54016
48 Horas 1 Hora	-6,48983	2,99931	-2,16377	0,55754	0,05	0	-17,23157	4,25192
48 Horas 24 Horas	-4,28824	2,99931	-1,42974	1	0,05	0	-15,02998	6,45351
72 Horas 1 Hora	-6,48983	2,99931	-2,16377	0,55754	0,05	0	-17,23157	4,25192
72 Horas 24 Horas	-4,28824	2,99931	-1,42974	1	0,05	0	-15,02998	6,45351
72 Horas 48 Horas	0	2,99931	0	1	0,05	0	-10,74175	10,74175
96 Horas 1 Hora	-10,57913	2,99931	-3,52718	0,05472	0,05	0	-21,32088	0,16262
96 Horas 24 Horas	-8,37754	2,99931	-2,79315	0,19017	0,05	0	-19,11929	2,36421
96 Horas 48 Horas	-4,0893	2,99931	-1,36341	1	0,05	0	-14,83105	6,65244
96 Horas 72 Horas	-4,0893	2,99931	-1,36341	1	0,05	0	-14,83105	6,65244

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	45,25559	11,3139	6,6947	0,0069
Error	10	16,89979	1,68998		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

- Tolueno

**ANOVAOneWay (16/07/2012 22:11:03)**

- Notes
- Input Data
- Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
1 hora	3	77,77778	5,09175	2,93972
24 horas	3	65,10673	0,71102	0,41051
48 horas	3	61,61741	0,78212	0,45156
72 horas	3	58,70279	1,60256	0,92524
96 horas	3	55,82923	2,06564	1,1926

- One Way ANOVA
- Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	874,09183	218,52296	32,25121	1,08681E-5
Error	10	67,75652	6,77565		
Total	14	941,84835			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

- Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,92806	0,0408	2,60301	63,80679

- Means Comparisons
- Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
24 Horas 1 Hora	-12,67105	2,12535	-5,96187	0,00139	0,05	1	-20,28277	-5,05933
48 Horas 1 Hora	-16,16037	2,12535	-7,60364	1,83241E-4	0,05	1	-23,77209	-8,54865
48 Horas 24 Horas	-3,48932	2,12535	-1,64176	1	0,05	0	-11,10104	4,1224
72 Horas 1 Hora	-19,07498	2,12535	-8,975	4,24284E-5	0,05	1	-26,6867	-11,46326
72 Horas 24 Horas	-6,40394	2,12535	-3,01312	0,13048	0,05	0	-14,01566	1,20778
72 Horas 48 Horas	-2,91462	2,12535	-1,37136	1	0,05	0	-10,52634	4,6971
96 Horas 1 Hora	-21,94855	2,12535	-10,32704	1,18261E-5	0,05	1	-29,56027	-14,33683
96 Horas 24 Horas	-9,2775	2,12535	-4,36517	0,0141	0,05	1	-16,88922	-1,66578
96 Horas 48 Horas	-5,78818	2,12535	-2,7234	0,21435	0,05	0	-13,3999	1,82354
96 Horas 72 Horas	-2,87356	2,12535	-1,35204	1	0,05	0	-10,48528	4,73816

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Homogeneity of Variance Test
- Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	20,22529	5,05632	3,75532	0,0408
Error	10	13,46442	1,34644		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

- Heptano

**ANOVA One Way (16/07/2012 22:26:16)**

- Notes
- Input Data
- Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
1 hora	3	66,6393	2,34003	1,35101
24 horas	3	62,61357	1,66081	0,95887
48 horas	3	59,73728	2,47354	1,4281
72 horas	3	57,45621	2,58588	1,49296
96 horas	3	56,8815	1,64235	0,94821

- One Way ANOVA
- Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	194,88315	48,72079	10,26283	0,00145
Error	10	47,47306	4,74731		
Total	14	242,35622			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.

- Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,80412	0,03592	2,17883	60,66557

- Means Comparisons
- Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
24 Horas 1 Hora	-4,02573	1,77901	-2,2629	0,47136	0,05	0	-10,39707	2,34561
48 Horas 1 Hora	-6,90202	1,77901	-3,8797	0,0306	0,05	1	-13,27336	-0,53068
48 Horas 24 Horas	-2,8763	1,77901	-1,6168	1	0,05	0	-9,24764	3,49504
72 Horas 1 Hora	-9,18309	1,77901	-5,16191	0,00424	0,05	1	-15,55443	-2,81175
72 Horas 24 Horas	-5,15736	1,77901	-2,89901	0,1586	0,05	0	-11,5287	1,21398
72 Horas 48 Horas	-2,28106	1,77901	-1,28221	1	0,05	0	-8,6524	4,09028
96 Horas 1 Hora	-9,7578	1,77901	-5,48497	0,00267	0,05	1	-16,12914	-3,38646
96 Horas 24 Horas	-5,73207	1,77901	-3,22206	0,09143	0,05	0	-12,10341	0,63927
96 Horas 48 Horas	-2,85578	1,77901	-1,60526	1	0,05	0	-9,22712	3,51556
96 Horas 72 Horas	-0,57471	1,77901	-0,32305	1	0,05	0	-6,94605	5,79663

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

- Homogeneity of Variance Test
- Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	1,21464	0,30366	0,27248	0,8891
Error	10	11,14433	1,11443		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

## ANEXO C

### Análises Estatísticas

Análise estatística para avaliação do efeito do pH nas propriedades do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju clarificado

- Tensão Superficial

**ANOVAOneWay (17/07/2012 18:27:59)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
2	3	48,73333	0,11547	0,06667
4	3	35,9	0,1	0,05774
6	3	31,5	0	0
7	3	30,6	0	0
8	3	31,66667	0,23094	0,13333
10	3	34	0	0
12	3	34,8	0	0
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	6	697,45238	116,24206	10613,4058	0
Error	14	0,15333	0,01095		
Total	20	697,60571			

**Null Hypothesis:** The means of all levels are equal  
**Alternative Hypothesis:** The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99978	0,00296	0,10465	35,31429
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
4 2	-12,83333	0,08545	-150,18648	1,55469E-22	0,05	1	-13,14943	-12,51724
6 2	-17,23333	0,08545	-201,67899	2,51196E-24	0,05	1	-17,54943	-16,91724
6 4	-4,4	0,08545	-51,49251	4,86203E-16	0,05	1	-4,7161	-4,0839
7 2	-18,13333	0,08545	-212,21154	1,23194E-24	0,05	1	-18,44943	-17,81724
7 4	-5,3	0,08545	-62,02507	3,63035E-17	0,05	1	-5,6161	-4,9839
7 6	-0,9	0,08545	-10,53256	1,02778E-6	0,05	1	-1,2161	-0,5839
8 2	-17,06667	0,08545	-199,72851	2,87794E-24	0,05	1	-17,38276	-16,75057
8 4	-4,23333	0,08545	-49,54203	8,32527E-16	0,05	1	-4,54943	-3,91724
8 6	0,16667	0,08545	1,95047	1	0,05	0	-0,14943	0,48276
8 7	1,06667	0,08545	12,48303	1,18164E-7	0,05	1	0,75057	1,38276
10 2	-14,73333	0,08545	-172,42188	2,2522E-23	0,05	1	-15,04943	-14,41724
10 4	-1,9	0,08545	-22,2354	5,34594E-11	0,05	1	-2,2161	-1,5839
10 6	2,5	0,08545	29,25711	1,23812E-12	0,05	1	2,1839	2,8161
10 7	3,4	0,08545	39,78966	1,75536E-14	0,05	1	3,0839	3,7161
10 8	2,33333	0,08545	27,30663	3,20236E-12	0,05	1	2,01724	2,64943
12 2	-13,93333	0,08545	-163,0596	4,91919E-23	0,05	1	-14,24943	-13,61724
12 4	-1,1	0,08545	-12,87313	7,93333E-8	0,05	1	-1,4161	-0,7839
12 6	3,3	0,08545	38,61938	2,65668E-14	0,05	1	2,9839	3,6161
12 7	4,2	0,08545	49,15194	9,29406E-16	0,05	1	3,8839	4,5161
12 8	3,13333	0,08545	36,66891	5,45192E-14	0,05	1	2,81724	3,44943
12 10	0,8	0,08545	9,36227	4,40918E-6	0,05	1	0,4839	1,1161

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	6	0,08423	0,01404	9,14943	3,4841E-4
Error	14	0,02148	0,00153		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

- Índice de Emulsificação

**ANOVAOneWay (17/07/2012 18:44:50)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
2	3	21,9	0,1	0,05774
4	3	56,96667	0,05774	0,03333
6	3	63	0,3	0,17321
7	3	64,93333	0,11547	0,06667
8	3	63,26667	0,25166	0,1453
10	3	59,56667	0,11547	0,06667
12	3	58	0	0
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	6	4078,05143	679,67524	24608,93103	0
Error	14	0,38667	0,02762		
Total	20	4078,4381			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0,05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99991	0,003	0,16619	55,37619
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
4 2	35,06667	0,13569	258,42574	7,81528E-26	0,05	1	34,56471	35,56863
6 2	41,1	0,13569	302,88872	8,46924E-27	0,05	1	40,59804	41,60196
6 4	6,03333	0,13569	44,46298	3,75103E-15	0,05	1	5,53137	6,53529
7 2	43,03333	0,13569	317,13653	4,45039E-27	0,05	1	42,53137	43,53529
7 4	7,96667	0,13569	58,71079	7,80979E-17	0,05	1	7,46471	8,46863
7 6	1,93333	0,13569	14,24781	2,10694E-8	0,05	1	1,43137	2,43529
8 2	41,36667	0,13569	304,85394	7,73621E-27	0,05	1	40,86471	41,86863
8 4	6,3	0,13569	46,4282	2,05516E-15	0,05	1	5,79804	6,80196
8 6	0,26667	0,13569	1,96521	1	0,05	0	-0,23529	0,76863
8 7	-1,66667	0,13569	-12,28259	1,45606E-7	0,05	1	-2,16863	-1,16471
10 2	37,66667	0,13569	277,58658	2,87175E-26	0,05	1	37,16471	38,16863
10 4	2,6	0,13569	19,16084	4,03426E-10	0,05	1	2,09804	3,10196
10 6	-3,43333	0,13569	-25,30214	9,12815E-12	0,05	1	-3,93529	-2,93137
10 7	-5,36667	0,13569	-39,54995	1,90899E-14	0,05	1	-5,86863	-4,86471
10 8	-3,7	0,13569	-27,26735	3,26641E-12	0,05	1	-4,20196	-3,19804
12 2	36,1	0,13569	266,04095	5,20476E-26	0,05	1	35,59804	36,60196
12 4	1,03333	0,13569	7,61521	5,08028E-5	0,05	1	0,53137	1,53529
12 6	-5	0,13569	-36,84778	5,09621E-14	0,05	1	-5,50196	-4,49804
12 7	-6,93333	0,13569	-51,09558	5,41543E-16	0,05	1	-7,43529	-6,43137
12 8	-5,26667	0,13569	-38,81299	2,47855E-14	0,05	1	-5,76863	-4,76471
12 10	-1,56667	0,13569	-11,54564	3,21857E-7	0,05	1	-2,06863	-1,06471

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	6	0,09101	0,01517	2,01878	0,13079
Error	14	0,10519	0,00751		

At the 0,05 level, the population variations are not significantly different.

## ANEXO D

### Análises Estatísticas

Análise estatística para avaliação do efeito da força iônica nas propriedades do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju clarificado

- Tensão Superficial

**ANOVAOneWay (17/07/2012 19:06:18)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
0%	3	31,66667	0,23094	0,13333
2,5%	3	29,5	0	0
5%	3	28,96667	0,05774	0,03333
10%	3	30	0	0
15%	3	36,5	0	0
20%	3	37	0,86603	0,5
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	193,10278	38,62056	287,26033	4,69369E-12
Error	12	1,61333	0,13444		
Total	17	194,71611			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99171	0,01136	0,36667	32,27222
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
2,5% 0%	-2,16667	0,29938	-7,23713	1,54906E-4	0,05	1	-3,25908	-1,07426	
5% 0%	-2,7	0,29938	-9,01858	1,62046E-5	0,05	1	-3,79241	-1,60759	
5% 2,5%	-0,53333	0,29938	-1,78145		1	0,05	0	-1,62574	0,55908
10% 0%	-1,66667	0,29938	-5,56702	0,00184	0,05	1	-2,75908	-0,57426	
10% 2,5%	0,5	0,29938	1,67011		1	0,05	0	-0,59241	1,59241
10% 5%	1,03333	0,29938	3,45155	0,07187	0,05	0	-0,05908	2,12574	
15% 0%	4,83333	0,29938	16,14436	2,50787E-8	0,05	1	3,74092	5,92574	
15% 2,5%	7	0,29938	23,38149	3,35337E-10	0,05	1	5,90759	8,09241	
15% 5%	7,5	0,29938	25,16294	1,41228E-10	0,05	1	6,44092	8,62574	
15% 10%	6,5	0,29938	21,71139	8,00585E-10	0,05	1	5,40759	7,59241	
20% 0%	5,33333	0,29938	17,81447	8,04258E-9	0,05	1	4,24092	6,42574	
20% 2,5%	7,5	0,29938	25,0516	1,4881E-10	0,05	1	6,40759	8,59241	
20% 5%	8,03333	0,29938	26,83305	6,61384E-11	0,05	1	6,94092	9,12574	
20% 10%	7	0,29938	23,38149	3,35337E-10	0,05	1	5,90759	8,09241	
20% 15%	0,5	0,29938	1,67011		1	0,05	0	-0,59241	1,59241

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	1,03901	0,2078	13,91074	1,2159E-4
Error	12	0,17926	0,01494		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

- Índice de Emulsificação

**ANOVAOneWay (17/07/2012 19:12:32)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
0%	3	63,33333	0,28868	0,16667
2,5%	3	64,4	0,1	0,05774
5%	3	65,43333	0,11547	0,06667
10%	3	64,83333	0,28868	0,16667
15%	3	57,93333	0,11547	0,06667
20%	3	55,93333	0,11547	0,06667
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	242,07778	48,41556	1340,73846	4,44089E-16
Error	12	0,43333	0,03611		
Total	17	242,51111			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0,05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99821	0,00307	0,19003	61,97778
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2,5% 0%	1,06667	0,15516	6,8747	2,56681E-4	0,05	1	0,50051	1,63282
5% 0%	2,1	0,15516	13,53457	1,87751E-7	0,05	1	1,53385	2,66615
5% 2,5%	1,03333	0,15516	6,65987	3,4904E-4	0,05	1	0,46718	1,59949
10% 0%	1,5	0,15516	9,66755	7,73123E-6	0,05	1	0,93385	2,06615
10% 2,5%	0,43333	0,15516	2,79285	0,24388	0,05	0	-0,13282	0,99949
10% 5%	-0,6	0,15516	-3,86702	0,0336	0,05	1	-1,16615	-0,03385
15% 0%	-5,4	0,15516	-34,80318	3,02837E-12	0,05	1	-5,96615	-4,83385
15% 2,5%	-6,46667	0,15516	-41,67789	3,53968E-13	0,05	1	-7,03282	-5,90051
15% 5%	-7,5	0,15516	-48,33775	6,03473E-14	0,05	1	-8,06615	-6,93385
15% 10%	-6,9	0,15516	-44,47073	1,63291E-13	0,05	1	-7,46615	-6,33385
20% 0%	-7,4	0,15516	-47,69325	7,08396E-14	0,05	1	-7,96615	-6,83385
20% 2,5%	-8,46667	0,15516	-54,56795	1,41745E-14	0,05	1	-9,03282	-7,90051
20% 5%	-9,5	0,15516	-61,22782	3,57579E-15	0,05	1	-10,06615	-8,93385
20% 10%	-8,9	0,15516	-57,3608	7,80368E-15	0,05	1	-9,46615	-8,33385
20% 15%	-2	0,15516	-12,89007	3,25571E-7	0,05	1	-2,56615	-1,43385

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	0,07827	0,01565	3,57183	0,03286
Error	12	0,05259	0,00438		

At the 0,05 level, the population variations are significantly different.

## ANEXO E

### Análises Estatísticas

Análise estatística para avaliação do efeito da temperatura nas propriedades do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju clarificado

- Tensão Superficial

**ANOVAOneWay (18/07/2012 10:53:27)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
·4C	3	31,5	0	0
·25C	3	31,66667	0,23094	0,13333
·50C	3	31,8	0	0
·75C	3	32,03333	0,05774	0,03333
·100C	3	32,1	0	0
·121C	3	30,9	0	0
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	2,86667	0,57333	60,70588 4,22171E-8
Error	12	0,11333	0,00944	
Total	17	2,98		

**Null Hypothesis:** The means of all levels are equal  
**Alternative Hypothesis:** The means of one or more levels are different  
At the 0,05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,96197	0,00307	0,09718	31,66667
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
·25C ·4C	0,16667	0,07935	2,10042	0,86253	0,05	0	-0,12287	0,4562
·50C ·4C	0,3	0,07935	3,78076	0,0393	0,05	1	0,01046	0,58954
·50C ·25C	0,13333	0,07935	1,68034		1	0,05	-0,1562	0,42287
·75C ·4C	0,53333	0,07935	6,72134	3,19455E-4	0,05	1	0,2438	0,82287
·75C ·25C	0,36667	0,07935	4,62092	0,00884	0,05	1	0,07713	0,6562
·75C ·50C	0,23333	0,07935	2,94059	0,18538	0,05	0	-0,0562	0,52287
·100C ·4C	0,6	0,07935	7,56151	9,99533E-5	0,05	1	0,31046	0,88954
·100C ·25C	0,43333	0,07935	5,46109	0,00218	0,05	1	0,1438	0,72287
·100C ·50C	0,3	0,07935	3,78076	0,0393	0,05	1	0,01046	0,58954
·100C ·75C	0,06667	0,07935	0,84017		1	0,05	-0,22287	0,3562
·121C ·4C	-0,6	0,07935	-7,56151	9,99533E-5	0,05	1	-0,88954	-0,31046
·121C ·25C	-0,76667	0,07935	-9,66193	7,77961E-6	0,05	1	-1,0562	-0,47713
·121C ·50C	-0,9	0,07935	-11,34227	1,35587E-6	0,05	1	-1,18954	-0,61046
·121C ·75C	-1,13333	0,07935	-14,28286	1,01946E-7	0,05	1	-1,42287	-0,8438
·121C ·100C	-1,2	0,07935	-15,12302	5,30958E-8	0,05	1	-1,48954	-0,91046

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	0,07605	0,01521	14,49412 9,92109E-5
Error	12	0,01259	0,00105	

At the 0,05 level, the population variations are significantly different.

- Índice de Emulsificação

**ANOVAOneWay (18/07/2012 11:02:13)**

- Notes**
- Input Data**
- Descriptive Statistics**

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
4	3	63,93333	0,11547	0,06667
25	3	63,63333	0,11547	0,06667
50	3	63,1	0,17321	0,1
75	3	65	0	0
100	3	66	0	0
121	3	64,53333	0,05774	0,03333
- One Way ANOVA**
  - Overall ANOVA**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	16,28	3,256	325,6	2,22922E-12
Error	12	0,12	0,01		
Total	17	16,4			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal  
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different  
At the 0.05 level, the population means are significantly different.
  - Fit Statistics**

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99268	0,00155	0,1	64,36667
  - Means Comparisons**
    - Bonferroni Test**

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
25 4	-0,3	0,08165	-3,67423	0,04773	0,05	1	-0,59793	-0,00207
50 4	-0,83333	0,08165	-10,20621	4,3069E-6	0,05	1	-1,13126	-0,5354
50 25	-0,53333	0,08165	-6,53197	4,20334E-4	0,05	1	-0,83126	-0,2354
75 4	1,06667	0,08165	13,06395	2,79983E-7	0,05	1	0,76874	1,3646
75 25	1,36667	0,08165	16,73818	1,65384E-8	0,05	1	1,06874	1,6646
75 50	1,9	0,08165	23,27015	3,54699E-10	0,05	1	1,60207	2,19793
100 4	2,06667	0,08165	25,31139	1,31763E-10	0,05	1	1,76874	2,3646
100 25	2,36667	0,08165	28,98563	2,65449E-11	0,05	1	2,06874	2,6646
100 50	2,9	0,08165	35,5176	2,37825E-12	0,05	1	2,60207	3,19793
100 75	1	0,08165	12,24745	5,77644E-7	0,05	1	0,70207	1,29793
121 4	0,6	0,08165	7,34847	1,33085E-4	0,05	1	0,30207	0,89793
121 25	0,9	0,08165	11,0227	1,85796E-6	0,05	1	0,60207	1,19793
121 50	1,43333	0,08165	17,55468	9,53517E-9	0,05	1	1,1354	1,73126
121 75	-0,46667	0,08165	-5,71548	0,00145	0,05	1	-0,7646	-0,16874
121 100	-1,46667	0,08165	-17,96292	7,30463E-9	0,05	1	-1,7646	-1,16874

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.  
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.
    - Homogeneity of Variance Test**
      - Levene's Test(Absolute Deviations)**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	0,04346	0,00869	7,82222	0,00175
Error	12	0,01333	0,00111		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.