



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

LAÍS MONTENEGRO TEIXEIRA

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR *Serratia marcescens*
UCP 1549 NA DESCONTAMINAÇÃO AMBIENTAL UTILIZANDO GORDURA
ANIMAL COMO SUBSTRATO**

CAMPINA GRANDE – PB

2018

LAÍS MONTENEGRO TEIXEIRA

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DO BLOSSURFACTANTE POR *Serratia marcescens*
UCP 1549 NA DESCONTAMINAÇÃO AMBIENTAL UTILIZANDO GORDURA
ANIMAL COMO SUBSTRATO**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do Título de Engenheira Sanitarista e Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo

**CAMPINA GRANDE – PB
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

T266p Teixeira, Lais Montenegro.

Potencial de aplicação do biossurfactante por *Serratia* *marcescens* UCP 1549 na descontaminação ambiental utilizando gordura animal como substrato [manuscrito] : / Lais Montenegro Teixeira. - 2018.

45 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.

"Orientação : Profa. Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo, Departamento de Química - CCT."

1. Resíduos agroindustriais. 2. Biossurfactante. 3. Casca de abacaxi . 4. Gordura animal .

21. ed. CDD 628

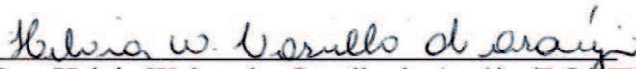
LAÍS MONTENEGRO TEIXEIRA

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR *Serratia marcescens*
UCP 1549 NA DESCONTAMINAÇÃO AMBIENTAL UTILIZANDO GORDURA
ANIMAL COMO SUBSTRATO**

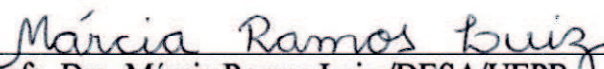
Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do Título de Engenheira Sanitarista e Ambiental.

Aprovada em: 23 / 03 / 2018.

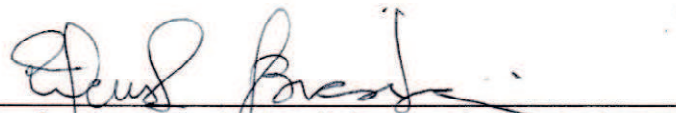
Nota: 100 (dez, zero)



Profª. Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo /DQ/UEPB
Orientadora



Profª. Dra. Márcia Ramos Luiz /DESA/UEPB
Examinadora



Profª. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira /DESA/UEPB
Examinadora

Aos meus pais por toda dedicação e sacrifício realizados para minha felicidade e educação,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, não somente acadêmica, mas em todos os momentos que nela vivencio, sendo o meu maior mestre e professor.

Agradeço aos meus pais, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, por me ensinarem a percorrer os caminhos corretos, orientando e intercedendo por mim, colocando a minha felicidade acima de qualquer coisa. Eles fazem de tudo por mim e por minha irmã, sou muito grata por tanto amor depositado em nós, na nossa família.

À minha irmã, Júlia, pela paciência e companheirismo, por ter acreditado em mim e me ouvir ensaiar as diversas vezes em casa, és muito especial.

A todos os meus familiares, que torcem sempre pela minha felicidade e meu sucesso.

Ao meu namorado, Lucas dos Santos, por todo amor, paciência, incentivo, companheirismo e principalmente pelo carinho, sempre me apoiando e estando ao meu lado em qualquer situação.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Helvia, pelo empenho dedicado na elaboração deste trabalho, por todo suporte e incentivo oferecidos e por ter me dado a oportunidade de trabalhar em sua equipe de pesquisa. Muito obrigada.

Ao técnico do laboratório da UEPB, Thiago dos Santos Alves, pela grande ajuda e disponibilidade quando precisei, assim como por todo conhecimento fornecido.

Ao meu amigo e parceiro do projeto, Augusto Ponciano, pela ajuda e trabalho em equipe. Ele foi essencial para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos, em especial minha colega de curso Tarciana Ramos, que esteve ao meu lado nas preocupações e nas felicidades, minha dupla, que sei que posso contar sempre que preciso.

À Universidade Estadual da Paraíba, pela oportunidade de realizar o curso e oferecer estrutura física na realização dos experimentos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“O senhor é meu pastor, nada me faltará.
Deitar-me faz em verdes pastos, guia
me mansamente a águas tranquilas”
(Salmo 23)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de um monômero de surfactante	15
Figura 2 – Formação de Micelas.....	16
Figura 3 – Colônias de pigmento vermelho (foto ilustrativa do cultivo de <i>S. marcescens</i> UCP 1549 crescida em ágar Luria Bertani-LB)	20
Figura 4 – Diagrama de Pareto para avaliação da Tensão Superficial na produção de biossurfactante utilizando <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549, a 155rpm, 28°C, em 48h (A), 72h (B), 96h (C) e 120h (D).....	27
Figura 5 – Comparativo dos Índice de Emulsificação 48h (A), em 72h (B), em 96h (C), em 120h (D).....	29
Figura 6 – Estabilidade da Tensão Superficial e do Índice de Emulsificação do biossurfactante produzido (48 horas, 28°C, modo cinético) no pH 2,0, 4,0, 6,0, e 10,0.....	31
Figura 7 – Estabilidade da Tensão Superficial e do Índice de Emulsificação do biossurfactante produzido (48 horas, 28°C, modo cinético) nas concentrações de NaCl 2,0, 4,0, 6,0, e 10,0%.....	32
Figura 8 – Teste de dispersão do Biossurfactante com óleo de motor	34
Figura 9 – Pó extraído do Biossurfactante utilizando <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz codificada do planejamento fatorial DCC 2 ²	24
Tabela 2 – Resultados da Tensão Superficial da fermentação em modo cinético da <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 em 48h, 72h, 96h e 120h	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos	17
Quadro 2 – Principais funções desempenhadas pelos biossurfactantes e seus respectivos campos de aplicação	18

RESUMO

Os resíduos agroindustriais líquidos e/ou sólidos têm despertado grande interesse quando utilizados como substrato alternativo para o fornecimento de matéria-prima de baixo custo. Uma dessas alternativas é a produção dos biossurfactantes, que são agentes anfipáticos de origem microbiana que possuem em sua estrutura uma região hidrofóbica e outra hidrofílica capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial. Eles atraem atenção principalmente devido à sua baixa toxicidade, biodegradabilidade na natureza, melhor compatibilidade ambiental e facilidade de operação, quando comparado com os sintéticos. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das cascas de abacaxi e da gordura animal como substratos para a produção de biossurfactantes por *Serratia marcescens* UCP 1549, de acordo com o planejamento fatorial 2². Os meios foram incubados à 28°C durante 48h, 72h, 96h e 120h. O biossurfactante produzido foi avaliado pelas medidas de índice de emulsificação e tensão superficial utilizando substratos hidrofóbicos o óleo pós-fritura, óleo de milho e óleo de girassol. O melhor resultado obtido para índice de emulsificação foi de 100% na condição 3 com óleo pós-fritura e girassol. Para tensão superficial a melhor condição foi a 1 que continha 5 gramas de casca de abacaxi e 2 g de gordura animal fermentado por 48 horas, onde obteve-se 27,7 mN/m. Para verificar a estabilidade dos biossurfactantes produzidos, os mesmos foram submetidos a variações de pHs (2,0, 4,0, 6,0, e 10,0) e em concentrações de NaCl (2,0%, 4,0%, 6,0% e 10,0%). Os resultados demonstraram a formação do biossurfactante com estabilidade em diferentes pHs como também em diferentes concentrações de sais. Com a melhor condição da redução da tensão superficial foi produzido 1 L do meio para a sua extração por precipitação ácida e a sua estabilidade em condições extremas de pH e concentrações de NaCl. Além disso, foi feito o teste de dispersão com o óleo de motor. O rendimento de biossurfactante foi de 0,87 g / L. A dispersão do óleo do motor queimado na água foi de 72%. Esses resultados demonstraram a boa capacidade de *S. marcescens* UCP 1549 para produzir biossurfactante com propriedades com aplicações promissoras como detergentes e produtos de limpeza doméstica.

Palavras-chave: Resíduos Agroindustriais; Índice de emulsificação; Tensão superficial.

ABSTRACT

Liquid and solid agroindustrial waste have been attracting great interest when used as an alternative substrate for supply of low cost raw material. One of these alternatives is the production of biosurfactants, which are amphipathic agents of microbial nature and have in their structure a hydrophobic and a hydrophilic region capable of reducing surface's and interfacial tension. They have been attracting great attention mainly due to its low toxicity, biodegradable nature, better environmental compatibility and ease of operation when compared to synthetic surfactants. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the influence of pineapple pees and animal fat as substrates for biosurfactants production by *Serratia marcescens* UCP 1549, in a 22 factorial design. The media were incubated at 28 ° C for 48h, 72h, 96h and 120h. The biosurfactant produced was evaluated by emulsification index and surface tension using hydrophobic substrates, the post-fry oil, corn oil and sunflower oil. The best result obtained for emulsification index was 100% in condition 3 with post-fry and sunflower oil. The best condition for surface tension was condition 1 that contained 5 grams of pineapple peel and 2 grams of animal fat, which was fermented for 48 hours and it was obtained 27.7 mN /m. To verify its stability, the produced biosurfactants were submitted to variations of both pH (2,0, 4,0, 6,0, and 10,0) and NaCl concentrations (2,0%, 4,0%, 6,0% and 10,0%). The results demonstrated the biosurfactant formation in different pHs and also in different salt's concentrations. Using the best result of the reduction of surface tension it was produced 1 L of the medium for its extraction by acid precipitation and its stability under extreme conditions of pH and NaCl concentrations. In addition, the dispersion test was performed with motor oil. The biosurfactant yield was 0.87 g / L. The engine burnt oil dispersion in water was 72%. These results demonstrated good capacity of *S. marcescens* UCP 1549 for producing biosurfactant with properties for promising applications such as detergent and household cleaning products.

Keywords: Agroindustrial residues; Emulsification index; Surface tension.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Objetivos.....	14
<i>1.1.1</i>	<i>Objetivo Geral.....</i>	<i>14</i>
<i>1.1.2</i>	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>14</i>
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Surfactantes.....	15
2.2	Biossurfactantes.....	16
2.3	Classificações dos biossurfactantes.....	16
2.4	Aplicações dos biossurfactantes.....	18
2.5	Produção dos biossurfactantes.....	19
2.6	<i>Serratia marcescens.....</i>	<i>19</i>
2.7	Resíduos agroindustriais.....	20
<i>2.7.1</i>	<i>Casca de Abacaxi.....</i>	<i>20</i>
<i>2.7.2</i>	<i>Gordura Animal.....</i>	<i>21</i>
<i>2.7.3</i>	<i>Óleo Pós- Fritura.....</i>	<i>21</i>
2.8	Fatores que influenciam a produção do biossurfactante.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Materiais.....	23
3.2	Métodos.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Tensão superficial.....	26
4.2	Índice de emulsificação.....	28
4.3	Estabilidade do biossurfactante frente a pH.....	30
4.4	Estabilidade do biossurfactante frente à força iônica.....	32
4.5	Teste de dispersão.....	33
4.6	Extração do biossurfactante.....	35
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Os constantes acidentes ambientais envolvendo derramamentos de petróleo e seus derivados vêm desencadeando a preocupação, com o desenvolvimento de técnicas que objetivam a descontaminação das regiões impactadas (LAWNICZAK *et al.*, 2013). A contaminação da água e do solo por hidrocarbonetos aromáticos vem aumentando devido à sua utilização em vários segmentos industriais. Os hidrocarbonetos são descritos como potenciais extremamente poluentes, tóxicos, cancerígenos e mutagênicos para humanos, além de apresentarem uma complexa remoção do meio ambiente, pois eles se ligam a diferentes matrizes devido à sua propriedade hidrofóbica.

Os métodos de remediação para ambientes contaminados são baseados em atividades química, física ou biológica. Considerando a crescente preocupação ambiental e econômica, a substituição dos surfactantes químicos pelos biológicos torna-se de grande interesse devido às características de baixa toxicidade, biodegradabilidade e síntese a partir de fontes renováveis e de baixo custo, fatores esses que os caracteriza como compostos reconhecidamente seguros (CAMPOS-TAKAKI, SARUBBO, ALBUQUERQUE, 2010).

Os biossurfactantes são surfactantes produzidos principalmente por microrganismos que promovem a queima de moléculas de hidrocarbonetos pela formação de micelas, aumentando sua mobilidade, biodisponibilidade e exposição a bactérias, favorecendo a biodegradação de hidrocarbonetos. Uma das características mais importantes do biossurfactante produzido é a sua capacidade para emulsionar hidrocarbonetos em solução, produzindo agentes tensoativos que podem causar a dispersão de hidrocarbonetos em emulsões de água em micro gotas ou micelas (IBRAHIM *et al.*, 2013).

Biossurfactantes são agentes anfipáticos contendo na sua estrutura uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica, possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre gases, líquidos e sólidos, além de possuir alto poder de emulsificação. São biodegradáveis, não tóxicos ou menos tóxicos que os surfactantes químicos. Os microrganismos para a produção de biossurfactantes podem ser bactérias, fungos filamentosos ou leveduras, sendo os principais tipos de biossurfactantes produzidos, os glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídeos, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros.

Os produtores de biossurfactantes bacterianos mais comumente relatados são de *Pseudomonas* e *Bacillus* genera (AYED *et al.*, 2015). Os biossurfactantes são estáveis mesmo em condições extremas em uma ampla gama de pH, temperatura e salinidade. A produção de biossurfactante é afetada por vários fatores que dependem do isolado, do meio (fonte de

Carbono, Nitrogênio e salinidade) e condições operacionais (pH, temperatura e velocidade de agitação).

Serratia marcescens tem sido relatada como microrganismo promissor na biodegradação de petróleo e derivados em processos de descontaminação ambiental (WONGSA *et al.*, 2004; OKORO *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2013). A ampliação da escala de produção de biossurfactante por *Serratia marcescens*, nas condições otimizadas e também a investigação do processo de remoção de óleo em solos contaminados, representa considerável contribuição à saúde pública e ao meio ambiente, tendo em vista a persistência e toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados do petróleo, em especial, o óleo diesel.

O grande problema na produção dos biossurfactantes é o custo envolvido em o processo. A fonte de carbono é responsável por parte considerável dos custos de produção de biossurfactantes (LI *et al.*, 2016). Como consequência, são realizadas diversas pesquisas avaliando subprodutos e rejeitos agroindustriais como fontes nutricionais alternativas, tornando-se uma estratégia atraente e de baixo custo e possibilitando a minimização dos problemas ambientais causados pelo descarte sem o tratamento prévio (MAKKAR *et al.*, 2011; BERGER *et al.*, 2014).

Desta forma, será explorado neste trabalho, o potencial dos resíduos sólidos como cascas de abacaxi, e rejeitos de gordura animal, objetivando alcançar um correto balanço nutricional entre fonte de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactante pela bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando como substrato gordura animal e óleos vegetais pós fritura. Além disso, tal processo torna-se uma estratégia atraente e de baixo custo para a produção deste metabólito secundário por promover a minimização dos problemas ambientais causados por esses rejeitos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir um biossurfactante com potencial de aplicação na descontaminação ambiental de petróleo e derivados com baixo custo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e selecionar as melhores condições produzidas pelo planejamento fatorial com diferentes concentrações dos resíduos para proceder à otimização.
- Avaliar a capacidade tensoativa e emulsificante do biossurfactante produzido.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante utilizando diferentes níveis de pH e concentrações de NaCl.
- Extrair o biossurfactante da melhor condição apresentada.

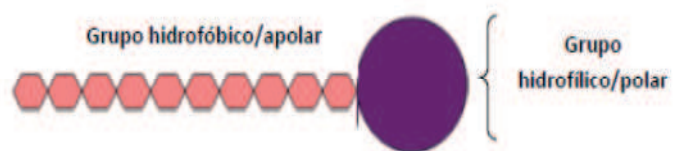
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Surfactantes

A palavra surfactante deriva da expressão em inglês "*surface active agents*" (agentes de atividade superficial) por apresentarem atividade nas superfícies e interfaces dos líquidos (ROSEN; KUNJAPPU, 2012). Os surfactantes são moléculas anfífilicas ou anfipáticas, visto serem constituídas de duas frações distintas – apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica) (Figura 1). Por essa razão, os surfactantes possuem a capacidade de interagir com líquidos de diferentes características, como, por exemplo, misturas de óleo (apolar) e água (polar). Também podem se posicionar na superfície do fluido formando uma película ou filme, resultando na redução da tensão superficial na interface líquido/ar (ZANA, 2005).

Essas características conferem aos surfactantes diversas possibilidades de aplicação para uso doméstico ou industrial, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, espumante, solubilização e dispersão de fases (MULLIGAN, 2005 *apud* COLLA; COSTA, 2003).

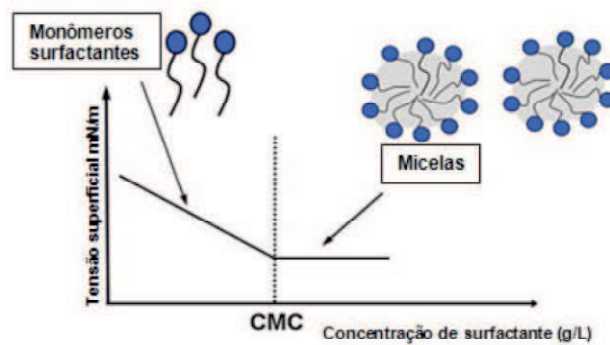
Figura 1 – Estrutura química de um monômero de surfactante



Fonte: ANDRADE (2014).

Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, formam-se a baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se Concentração Micelar Crítica (CMC), sendo esta uma importante característica de um surfactante. Quando a concentração de surfactante aumenta e atinge a Concentração Micelar Crítica, a adição de novos monômeros resulta na formação de novas micelas, como ilustrado na Figura 2, de tal maneira que a concentração de monômeros permanece essencialmente constante aproximadamente igual à CMC.

Figura 2 – Formação das micelas



Fonte: SILVA (2012).

As micelas, portanto, são agregados de monômeros de surfactantes que a partir de uma determinada CMC se associam.

2.2 Biosurfactantes

Biosurfactantes são compostos de origem microbiana que possuem atividade superficial, ou seja, têm a capacidade de reduzir a tensão superficial (fases líquido-gás) ou a tensão interfacial (fases imiscíveis líquido-líquido). São produzidos, principalmente, pelo crescimento aeróbio de microrganismos como leveduras, fungos filamentosos e por bactérias (MARCHANT e BANAT, 2012; SILVA *et al.*, 2014). São capazes de reduzir as forças de repulsão entre fases diferentes, interface ou superfície e permitem que as duas fases se misturem mais facilmente (LUNA *et al.*, 2013).

A produção de biosurfactantes, entre outras funções, é uma das formas encontradas pelos microrganismos para conseguir metabolizar os hidrocarbonetos. A parte lipofílica (característica apolar) do biosurfactante se liga ao contaminante (também com característica apolar), facilitando assim, à sua entrada (pinocitose) na célula e sua posterior mineralização (metabolização, ou seja, crescimento plástico e transformação em CO₂) (HOLMBERG, 2001).

2.3 Classificação dos biosurfactantes

Os biosurfactantes são classificados de acordo com suas características químicas e origem microbiológica (Quadro 1). As principais classes destes metabólitos secundários com baixo peso molecular incluem os glicolípídeos, os lipopeptídeos e os fosfolípídeos (PIRÔLLO,

2006; SOBERÓN-CHÁVEZ e MAIER 2011). Por outro lado, os biossurfactantes de alto peso molecular incluem os polissacarídeos, as proteínas, os lipopolissacarídeos, as lipoproteínas ou os complexos de misturas desses biopolímeros (SINGH, 2012).

Quadro 3 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos

TIPO DE BIOSSURFACTANTE	MICRORGANISMO ENVOLVIDO
GLICOLIPÍDEOS	
RAMNOLIPÍDEOS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SOFOROLIÍDEOS	<i>Torulopsis bombicola</i> , t. <i>Apicola</i>
TREHALOLIPÍDEOS	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>mycobacterium</i> sp
LIPOPEPTÍDEOS	
SURFACTINA	<i>Bacillus subtilis</i>
PEPTÍDEO-LIPÍDIO	<i>Bacillus lichenformis</i>
VISCOSINA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SUBTILISINA	<i>Bacillus subtilis</i>
SERRAWETINA	<i>Serratia marcescens</i>
GRAMICIDINA	<i>Bacillus brevis</i>
POLIMIXINA	<i>Bacillus polymyxa</i>
ÁCIDOS GRAXOS	
ÁCIDOS GRÁXOS	<i>Corynebacterium lepus</i>
LIPÍDEOS NEUTROS	<i>Nocardia erythropolis</i>
FÓSFOLIPÍDEOS	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
BIOTENSOATIVOS PARTICULADOS	
EMULSAN	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
BIODISPERSAN	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
LIPOSAN	<i>Candida lipolytica</i>
CARBOIDRATO-LIPÍDEO-PROTEÍNA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MANANA-LIPÍDEO-PROTEÍNA	<i>Candida tropicalis</i>
BIOTENSOATIVOS POLIMÉRICOS	
VESÍCULAS	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
CÉLULAS	DIVERSAS BACTÉRIAS

Fonte: Adaptado de NISTCHKE; PASTORE (2002).

2.4 Aplicações dos biossurfactantes

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de microrganismos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em diversos campos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001) como apresentado no Quadro 2.

Os principais usos relacionam-se à indústria petrolífera, devido ao aumento da solubilidade dos componentes do petróleo, incluindo a limpeza de derramamento de óleos, a remoção de petroderivados de tanques de estocagem, a recuperação melhorada de petróleo e a biorremediação de ambientes terrestres e aquáticos contaminados com hidrocarbonetos (RON e ROSENBERG, 2002; SILVA *et al.*, 2014).

Quadro 4 – Principais funções desempenhadas pelos biossurfactantes e seus respectivos campos de aplicação

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos.
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, tintas e têxteis
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos, e flotação de minérios.
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistema de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos.
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcário-água
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR).

Fonte: Adaptado de NISTCHKE; PASTORE (2002).

2.5 Produção de biossurfactantes

A produção de moléculas com atividade de redução da tensão superficial ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso, o que impede a sua oxidação e assimilação. As vias dessas moléculas nos microrganismos envolvem primeiramente a formação das moléculas que irão constituir as porções hidrofóbicas e hidrofílicas do mesmo, estando envolvidos os mecanismos de biossíntese de ácidos graxos, carboidratos e derivados. A assimilação de n-alcenos pode ocorrer através de três mecanismos: (a) assimilação de hidrocarbonetos dissolvidos no meio, geralmente cadeias carbonadas curtas que apresentam solubilidade limitada em meio aquoso; (b) mecanismo de contato direto, no qual ocorre a formação de agregados compostos de células, gotas de hidrocarbonetos e ar, ocasionando um aumento na lipoficidade da superfície celular induzida pelo contato com o hidrocarboneto, que é absorvido pela célula através das camadas lipofílicas do envelope celular; ou (c) assimilação de hidrocarbonetos emulsificados, onde a partir do contato com a célula, o substrato é convertido em pequenas gotículas, ocasionando uma pseudo-solubilização através de agentes extracelulares produzidos pelas células (KOSARIC; CAIRNS, 1987).

Após a entrada na célula, os hidrocarbonetos são oxidados a álcoois, depois a aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, através da oxidação terminal. Cadeias menores de ácidos graxos também podem ser obtidas pelo ataque em porções subterminais, obtendo-se álcoois secundários e cetonas, que após uma clivagem levam à formação de ácidos graxos de cadeias curtas. Apesar disto, a incorporação de hidrocarbonetos geralmente leva à presença nas moléculas de biossurfactantes de ácidos graxos de cadeia carbônica de mesmo número de carbonos que a fornecida pelo substrato.

2.6 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens é um microrganismo do gênero *Serratia* sp. É uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, com diâmetro que varia de 0,9-2,0 µm de comprimento, anaeróbio facultativo, de crescimento quimioautotrófico e geralmente móvel devido ao flagelo peritriquio (ARAÚJO, 2010).

Encontrada no solo, água, plantas e trato intestinal de seres humanos e animais. (KONEMAN *et al*, 2001). Mais recentemente, *Serratia* sp. tem sido relatada como produtora

de lipídeos com perfil químico similar ao biodiesel, aumentando assim o potencial de aplicação deste microrganismo (BHARTI *et al.*, 2014).

Estudos recentes com a *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549, isolada do semiárido de Pernambuco, demonstraram seu potencial biotecnológico para produzir biossurfactante em meio contendo resíduos agroindustriais (ARAÚJO, 2010; ALVES *et al.*, 2014).

Figura 1 – Colônias de pigmento vermelho (foto ilustrativa do cultivo de *S. marcescens* UCP 1549 crescida em ágar Luria Bertani-LB)



Fonte: ARAÚJO, (2009).

2.7 Resíduos agroindustriais

2.7.1 Casca de Abacaxi

A poluição ambiental ocorre com a liberação no meio ambiente de rejeitos gerados por diversas fontes, prejudicando o funcionamento de todos os ecossistemas e afetando os seres vivos (MARTINEZ *et al.*, 2003). Os resíduos de várias frutas, legumes e hortaliças são, na maioria das vezes, desprezados pelas indústrias. Atualmente, estes resíduos estão sendo utilizados como fonte alternativa de nutrientes para a produção de biopolímeros.

O abacaxi (*Ananas comosus*), originário da América do Sul, foi levado para a Europa logo após o descobrimento da América. O seu cultivo disseminou por vários países, como Portugal, Alemanha, Inglaterra e França, devido a grande aceitação do fruto pelos consumidores. O gênero *Ananas mill*, o qual o abacaxi pertence, é vastamente distribuído nas regiões tropicais por intermédio da espécie *Ananas comosus* (GRANADA *et al.*, 2004).

A composição química do abacaxi varia muito com a época em que é produzido. De modo geral, a produção ocorre no período de verão e gera frutas com maior teor de açúcares e menos acidez. O abacaxi destaca-se pelo seu valor energético, devido à sua alta composição de

açúcares e valor nutritivo pela presença de sais minerais (Cálcio, Fósforo, Magnésio, Potássio, Sódio, Cobre e Iodo) e de vitaminas (C, A, B1, B2 e Niacina). No entanto, apresenta baixo teor proteico e de gordura (inferiores a 0,5%).

2.7.2 Gordura Animal

A gordura animal e o sebo podem ser obtidos em grandes quantidades na indústrias de processamento de carne e têm sido usados como meio para cozinhar alimentos. Recentemente, entretanto, estas gorduras têm perdido a maior parte do mercado para os óleos vegetais devido ao menor dano provocado por estes últimos à saúde (MANEERAT, 2005). Deshpande e Daniels (1995) usaram gordura animal para a produção de biossurfactantes compostos por sofrolipídeos de *Candida bombicola*.

A utilização de gordura como fonte de carbono promoveu pouco crescimento, embora a adição de glicose tenha permitido um nível mais elevado do crescimento da biomassa.

2.7.3 Óleo Pós- Fritura

O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos está relacionado à seleção de substrato, de modo que contenha um balanço correto de nutrientes, permitindo o desenvolvimento celular, como também, a produção de insumo de grande interesse (NISTCHKE; PASTORE, 2002). Dentre os substratos, os óleos vegetais extraídos de sementes de várias plantas por meio de processamentos industriais são refinados sem perder a cor, sabor e odor originais (JORGE *et al.*, 2005).

Assim, a crescente utilização de óleos comestíveis para preparação de produtos fritos tem levado a um controle mais rigoroso dos óleos de fritura, uma vez que óleos e gorduras aquecidos e altamente oxidados podem apresentar substâncias potencialmente tóxicas. Entre os principais riscos à saúde envolvidos no consumo dessas substâncias pode-se citar a pré-disposição à arteriosclerose e a ação mutagênica ou carcinogênica (SANIBAL; FILHO, 2002).

Durante o processo de fritura óleos e gorduras estão expostos à ação da umidade proveniente do alimento responsável pela alteração hidrolítica, o oxigênio do ar que entra na massa de óleo através da superfície do recipiente possibilitando a alteração oxidativa e a elevada temperatura em que ocorre a operação, por volta de 180°C, que provoca alteração térmica. Estes fatores contribuem para reduzir à qualidade do óleo e modificar sua estrutura,

principalmente, a composição em ácidos graxos, observando-se diferenças entre o grau de insaturação.

2.8 Fatores que influenciam a produção do biossurfactante

Os parâmetros do meio de cultivo irão favorecer ou reprimir a síntese do biossurfactante. O efeito sobre a produção está relacionado à fonte de Carbono, Nitrogênio, sais, concentração de NaCl, pH, temperatura, agitação, aeração e ao microrganismo produtor (ROSETO *et al.*, 2003).

A fonte de carbono pode ser responsável pelo crescimento do microrganismo, por isso é considerada um dos fatores que mais influenciam na síntese do biossurfactante. A síntese de surfactante de origem microbiana exige uma combinação de fontes de carbono hidrofílica (glicose, lactose e n-alcanos) e hidrofóbica (óleo de soja, óleo de milho, óleo de linhaça, azeite de oliva e seus efluentes obtidos da produção industrial) (RUFINO, 2014; SAJNA, 2013).

Utilizando fontes de carbono hidrofóbico Bhangale *et al.* (2014) relacionaram os diferentes ácidos graxos oriundos do óleo de mamona e glicerol com a estrutura do surfactante produzido por *Starmerella bombicola*.

As fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio são consideradas outro fator que tem influência na produção de biossurfactantes. O extrato de levedura combinado aos sais de KH_2PO_4 e/ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são as fontes mais utilizadas, uma vez que, a variação das suas concentrações influencia diretamente na relação C/N (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012). Essa razão é avaliada em muitos estudos, pois está diretamente relacionada ao metabolismo microbiano.

Geralmente, a produção de biossurfactantes ocorre em concentrações limitantes de nitrogênio, na fase estacionária de crescimento do microrganismo (DECESARO *et al.*, 2013). Kiran *et al.* (2009) concluíram que a adição de 10% de NaNO_3 e 25% de extrato de levedura produziu um pequeno aumento na produção de biotensioativo por *Aspergillus ustus*, sendo, portanto, necessário apenas adição da fonte orgânica de Nitrogênio ao meio.

Os parâmetros físico-químicos temperatura, agitação, aeração e pH são fatores que influenciam no rendimento da produção, assim como os fatores bioquímicos.

Todos os processos de crescimento são dependentes das reações químicas que são afetadas pela temperatura. Os microrganismos podem crescer tanto em uma ampla faixa de temperatura, quanto em uma faixa menor. A temperatura pode favorecer o decréscimo ou aumento da síntese de biossurfactante, pois o aumento da biomassa favorece a liberação dos

produtos metabólitos da célula microbiana (SAHOO *et al.*, 2011). O pH do meio influencia o crescimento celular e a síntese de metabólitos secundários. A agitação e a aeração possuem efeitos combinados, pois ambos facilitam a transferência de oxigênio no meio de fermentação (AQUARONE *et al.* 2001), auxiliando assim, a dispersão dos nutrientes e sua homogeneização para favorecer o crescimento dos microrganismos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais contemplados neste estudo foram realizados no Laboratório de Saneamento da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), juntamente da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) na análise da Tensão Superficial.

3.1 Materiais

- ✓ **Microrganismo:** O microrganismo *Serratia marcescens* UCP 1549, foi isolado do solo de Bananeiras em Recife - PE. Esta linhagem encontra-se depositada no banco de Culturas do Núcleo em Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, mantida em tubos de Ágar nutriente inclinado (AN) a 4°C.
- ✓ **Meio de cultura e condições de cultivo:** O microrganismo foi cultivado em frascos de *Erlenmeyers* de 250 mL de capacidade com 50 mL de meio Luria Bertani (LB), constituído por: triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (10 g/L), suplementado com glicose (5 mg/ml) segundo Konishi *et al.* (2000).
- ✓ **Substrato:** Resíduos agroindustriais como cascas de abacaxi e gordura animal e óleo vegetal pós-fritura separados, como meio de produção de baixo custo.

3.2 Métodos

- ✓ **Preparação do inóculo:** as culturas foram mantidas em meio LB, a 28°C por 16 horas em modo cinético, para obtenção do pré-inóculo.
- ✓ **pH:** o pH da fermentação foi acompanhado por determinação em potenciômetro.
- ✓ **Planejamento fatorial Delineamento Composto Central (DCC):** o experimento foi realizado com o planejamento experimental DCC do tipo 2² sendo realizado de acordo

com as condições estabelecidas na Tabela 1 com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes casca de abacaxi e gordura animal sobre a variável resposta tensão superficial e índice de emulsificação.

Tabela 1: Matriz codificada do planejamento fatorial DCC 2²

CONDIÇÕES	CASCA DE ABACAXI	GORDURA ANIMAL
1	-1	-1
2	1	1
3	-1	1
4	1	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0

Fatores (%): Casca de Abacaxi: -1 (5), 1 (7); 0 (6); Gordura animal: -1 (2), 1 (6); 0 (4).

- ✓ **Produção do biossurfactante:** a produção do biossurfactante foi realizada por fermentação usando frascos de *Erlenmeyers* de 250 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de acordo com o planejamento fatorial Delineamento Composto Central (DCC). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital por um período de 48h, 72h, 96h e 120h. Alíquotas foram retiradas até o final da fermentação. As células foram separadas do líquido metabólico por centrifugação a 10.000g por 15 min a 10°C, com posterior filtração em Millipore de 0,45 µm para separação total das células. O líquido metabólico livre de células foi utilizado para as seguintes determinações: tensão superficial e índice de emulsificação.
- ✓ **Tensão superficial:** a tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante foi medido em um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltda., Finland) utilizando o anel de DU NUOY, através de sua imersão no líquido, registrando-se a força requerida para retirá-lo através da interface ar-líquido (KUYUKINA, *et al.*, 2001).
- ✓ **Índice de emulsificação:** a determinação do índice de emulsificação foi realizada durante 24 horas (E₂₄) em todas as condições do planejamento experimental utilizando para cada condição substratos diferentes como: óleo girassol, óleo pós-fritura e óleo de milho. Foi determinado pela adição de 2,0 mL dos substratos testados em 2,0 mL do sobrenadante, misturando-se em vórtex por 2 min e deixando em repouso por 24 h. O

índice foi calculado como porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm) (COOPER E GOLDENBERG, 1987).

- ✓ **Isolamento e Extração do biossurfactante:** o biossurfactante produzido na melhor condição, selecionada do planejamento fatorial, após 48 horas de cultivo da *S. marcescens* UCP 1549, devido a menor tensão superficial será extraído a partir do líquido metabólico livre de células (centrifugação 4000 rpm), seguido de filtração em membrana de millipore 0,45µm para retirada das células e submetido ao processo de extração de acordo com a metodologia descrita por Nitschke e Pastore (2002). O processo de isolamento do biossurfactante foi realizado através da precipitação, baixando o pH líquido metabólico livre de células a pH 2 com uma solução de HCl 5N, e colocado em *over night.*, no dia seguinte, centrifugou-se, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi levado à estufa a 37°C por 24 h (NAVON- VENEZIA *et al.*,1995).
- ✓ **Estabilidade do biossurfactante:** foi avaliada a partir da melhor condição selecionada do planejamento fatorial, de acordo com a determinação da tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células com diferentes pH (2,0, 4,0, 6,0 e 10,0), diferentes concentrações de NaCl (2,0%, 4,0%, 6,0% e 10,0%) por 10 minutos.
- ✓ **Dispersão do óleo de motor queimado:** seguindo a metodologia descrita por Youssef *et al.* (2004) o teste foi realizado utilizando uma placa de *Petri* com 140mm de diâmetro com 5 mL de água mais 15µL do óleo de motor queimado. O volume de 10µL do líquido metabólico livre de células (da melhor condição apresentada – condição 1, 48h) foi adicionado na superfície do óleo e a formação de uma zona clara indicou o tamanho da zona de dispersão, a qual foi medida em mm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tensão superficial

Os resíduos industriais apresentam um grande potencial para a produção de biossurfactantes com um custo reduzido, já que podem ser utilizados como fonte de Carbono e ou Nitrogênio pelos microrganismos, uma vez que, para a produção de biossurfactante a fonte de Carbono representa 50% do custo total da produção.

A Tabela 2 apresenta os resultados das condições fermentadas em modo cinético da *Serratia marcescens* UCP 1549 em 48h, 72h, 96h e 120h em relação às Tensões Superficiais.

Tabela 2 – Resultados da Tensão Superficial (TS) da fermentação em modo cinético da *Serratia marcescens* UCP 1549 em 48h, 72h, 96h e 120h

CONDIÇÕES	CASCA DE ABACAXI	GORDURA ANIMAL	TS (mN/m)- 48h	TS (mN/m)- 72h	TS (mN/m) - 96h	TS (mN/m)- 120h
1	-1	-1	27,70	41,38	27,90	31,53
2	1	1	29,46	29,46	36,50	29,52
3	-1	1	34,78	36,75	36,00	30,55
4	1	-1	33,53	47,66	31,23	28,00
5	0	0	39,01	40,13	38,50	36,98
6	0	0	40,32	40,06	37,30	30,29
7	0	0	39,78	37,83	38,20	34,25
8	0	0	39,65	36,40	38,40	36,30

Fatores (%): Casca de Abacaxi: -1 (5), 1 (7); 0 (6); Gordura animal: -1 (2), 1 (6); 0 (4).

Entre as condições analisadas, a que apresentou o melhor resultado para tensão superficial foi a condição 1 que continha 5 gramas de casca de abacaxi e 2 g de gordura animal fermentado por 48 horas com 27,7 mN/m. Esse resultado exibiu uma grande atividade superficial (tensoativo), propriedade esta que o caracteriza como um bom tensoativo.

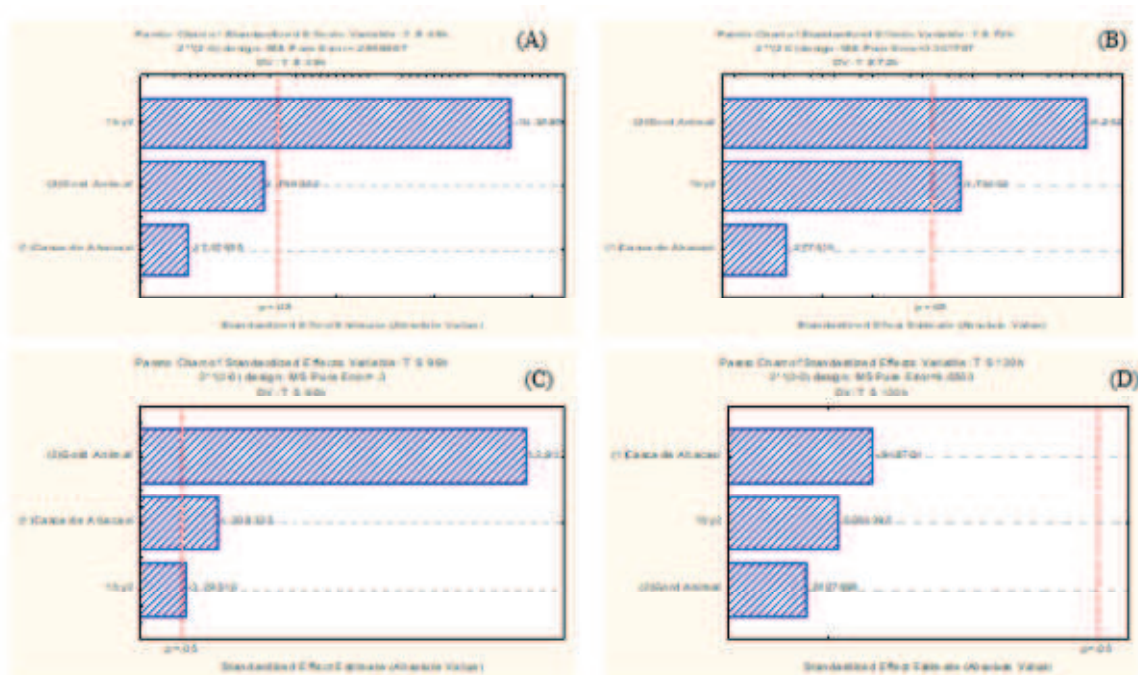
Alves *et al.* (2014) utilizando a *Serratia marcescens* UCP 1549 com o mesmo meio de cultivo das condições analisadas, obteve o melhor resultado de tensão superficial com o valor de 33,0 mN/m.

Velioglu e Urek (2015) quando cultivaram *P. sajor-caju* em cultivo sólido, extraíram um biossurfactante com uma tensão superficial de 41,93 mN/m após 16 dias de fermentação.

Com a finalidade de obter uma análise mais detalhada da eficiência na redução da tensão superficial através da interação das variáveis (casca de abacaxi e gordura animal), foi

feito o Diagrama de Pareto realizado pelo pacote computacional “STATISTICA” versão 10, sendo considerada a condição 1 que apresentou melhor resultado de Tensão Superficial. De acordo com esse diagrama feito para as condições obtidas, as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal foram significativas estatisticamente e contribuíram positivamente para a redução da tensão superficial. A Figura 4 apresentada o Diagrama de Paretos para a cinética 155rpm na produção do biossurfactante em 48, 72, 96 e 120h.

Figura 4 – Diagrama de Pareto para avaliação da Tensão Superficial na produção de biossurfactante utilizando *Serratia marcescens* UCP 1549, a 155rpm, 28°C, em 48h (A), 72h (B), 96h (C) e 120h (D)



Fonte: Própria (2016).

Na Figura 4 (A) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal foram significativas estatisticamente e contribuíram positivamente para a redução da tensão superficial. Entretanto, o efeito das variáveis independentes gordura animal e casca de abacaxi foram estatisticamente representativas, mas contribuíram negativamente para a redução da tensão superficial com as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial de 2^2 sobre a variável resposta tensão superficial após 48 horas de cultivo a 28° C e 155 rpm com nível de confiança de 95%.

De acordo com a Figura 4 (B) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal foram significativas estatisticamente e contribuíram positivamente para a redução da tensão superficial, assim como o efeito da variável independente gordura animal. Entretanto, a variável

independente casca de abacaxi foi estatisticamente representativa, mas contribuiu negativamente para a redução da tensão superficial, uma vez que, essa variável está abaixo do nível de confiança.

Na Figura 4 (C) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal foram significativas estatisticamente e contribuíram positivamente para a redução da tensão superficial, assim como o efeito das variáveis independentes gordura animal e casca de abacaxi. Portanto, obteve se resultados satisfatórios para as condições de rotação de 155 rpm em 96 horas.

Para a Figura 4 (D) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal não foram significativas estatisticamente e contribuíram negativamente para a redução da tensão superficial, assim como o efeito das variáveis independentes gordura animal e casca de abacaxi. Portanto, na cinética de 120h a redução da tensão superficial não obteve um resultado satisfatório, uma vez que, a interação dos substratos analisados não obteve resultados significativos.

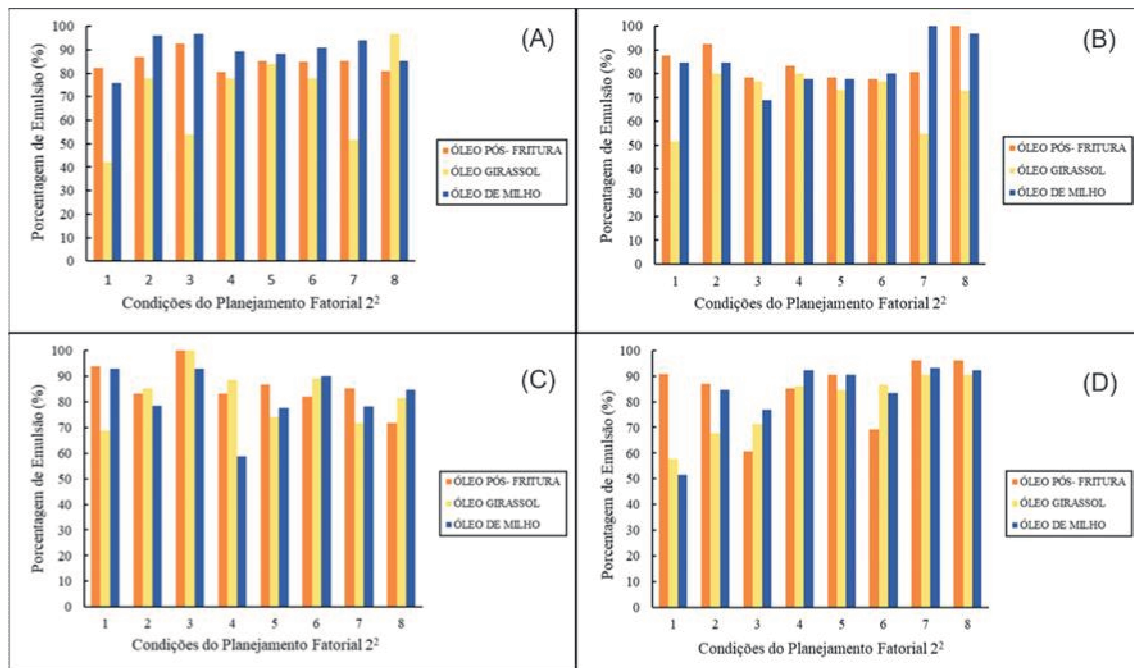
4.2 Índice de emulsificação

Os bioemulsificantes são caracterizados pela formação de macro e micro emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou água em hidrocarbonetos. Para tanto, neste trabalho foi comprovada a emulsificação devido à formação de emulsões entre as duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade, líquido metabólico livre de células (polar) e hidrocarboneto (apolar) ocorrendo à dispersão de um líquido em outro.

O índice de emulsificação avaliado refere-se ao valor quantitativo da emulsão produzida pelo biossurfactante presente no líquido metabólico, e quanto maior esse valor, mais estável será a emulsão formada. As análises de índice de emulsificação de acordo com o planejamento estatístico foram representadas a partir de gráficos comparativos entre os diferentes tipos de óleos (pós - fritura, girassol e milho) e tempos de rotação.

A Figura 5 mostra o comparativo dos Índices de Emulsificação para as condições do modo cinético de 48h, 72h, 96h e 120h a 28°C, modo cinético.

Figura 5 – Comparativo dos Índice de Emulsificação em 48h (A), em 72h (B), em 96h (C), em 120h (D)



Fonte: Própria (2016).

A capacidade de emulsificação foi melhor observada na condição 3 apresentada na Figura 5 (C), que continha 5 gramas de casca de abacaxi e 6g de gordura animal, fermentado por 96 horas utilizando o óleo pós-fritura e óleo girassol, com uma emulsão de 100%.

Na análise dos resultados de todas as condições referentes à emulsificação do óleo de girassol, observou-se que a efetividade dos biossurfactantes foi baixa quando comparado com a efetividade de emulsão formada pelos óleos pós-fritura e milho.

De acordo com Martins (2017), o microrganismo *Corynebacterium aquaticum* mostrou uma produção eficiente de biossurfactante ao usar peixe e resíduos de bagaço como fonte de carbono. A tensão superficial obtida para esses tratamentos foi de 27,8 e 33,9 mN /m e capacidade de emulsão foi de 87,6 e 61,6%, respectivamente.

Velioglu e Urek (2015) utilizando *Pleurotus sajor-caju* em cultivo sólido, alcançaram um valor de índice de emulsificação sobre óleo de soja de 54,55% após 16 dias de fermentação. Estes autores também cultivando *Pleurotus ostreatus* em cultivo submerso, obtiveram valor máximo de índice de emulsificação sobre óleo de soja de 60% após 13 dias de fermentação. Esses valores são inferiores ao encontrado no presente trabalho, cujos índices de emulsificação foram alcançados em menor tempo de cultivo.

Rodríguez (2015) utilizando *Serratia marcescens* obteve um índice de emulsificação de 64% com o indutivo o diesel. Segundo Bezerra (2012) utilizando *Pseudomonas aeruginosa*

obteve resultados variando de 50 a 68% e Santos *et al.* (2010) utilizando *Pseudomonas fluorescens* produziu índices de emulsificação de 61%, 54% e 50% os quais foram considerados bons bioemulsificantes.

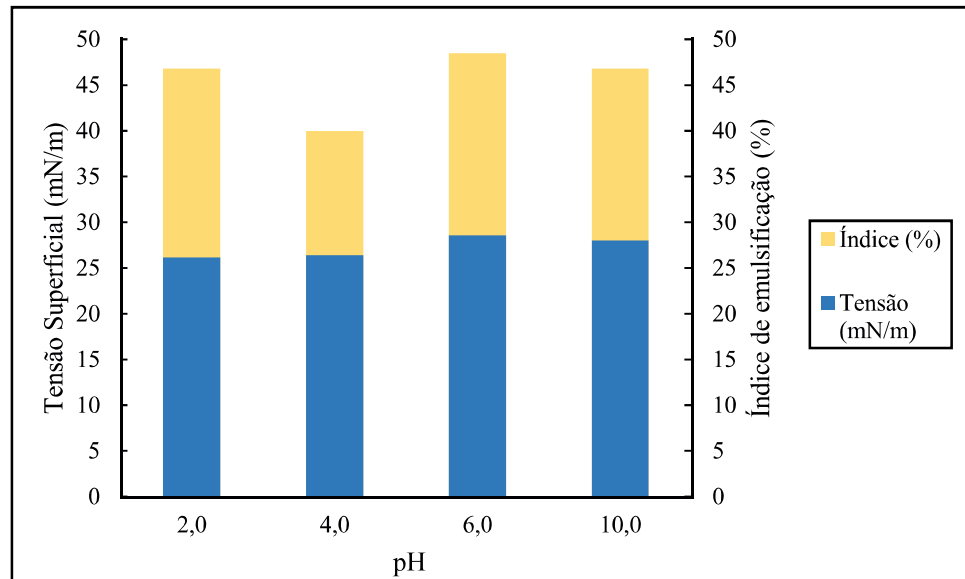
Pode-se então comprovar a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido pela bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549, uma vez que, este foi capaz de formar emulsões entre duas fases fluidas que apresentavam diferentes graus de polaridade. O índice de emulsificação pode ser alterado de acordo com a afinidade do biossurfactante produzido pelo microrganismo e o hidrocarboneto utilizado para a emulsificação.

4.3 Estabilidade do biossurfactante frente a pH

Os biossurfactantes apresentam propriedades que os caracterizam como potenciais insumos em processos industriais. Na medida em que estes processos estão, frequentemente, associados a condições extremas, faz-se necessária uma avaliação da estabilidade destes. Para determinar o efeito do pH na estabilidade do biossurfactante, variou-se o pH da solução contendo o biossurfactante (condição 1 de 48 h) purificado e dissolvido em água destilada, entre 2,0, 4,0, 6,0 e 10,0. Utilizou-se uma solução de NaOH ou HCl 1M para ajuste do pH no valor desejado. O efeito do pH na atividade emulsificante foi avaliado através da medida de tensão superficial e índice de emulsificação.

A Figura 6 apresenta o resultado da estabilidade produzida do biossurfactante nas variações de pH.

Figura 6 — Estabilidade da Tensão Superficial e do Índice de Emulsificação do biossurfactante produzido (48 horas, 28°C, modo cinético) no pH 2,0, 4,0, 6,0, e 10,0



Fonte: Própria (2016).

De acordo com a Figura 6, a melhor eficiência tanto para a tensão superficial quanto para o índice de emulsificação é obtida quando o meio está com pH 6,0 (próximo de neutro) e pH 10,0 (mais alcalino), pois não apresentou variações nas variáveis analisadas.

É possível identificar que não há uma variação tão brusca nos resultados obtidos, mostrando que o biossurfactante produzido apresenta uma boa estabilidade quanto a variações de pH.

De acordo com o trabalho de Soares (2014) utilizando linhagens de *Bacillus* sp as condições avaliadas a 45° C variando o pH apresentaram um aumento da Tensão Superficial (TS) para pH superior a 10,0 e inferior a 5,0. Percebeu-se pouca variação da Tensão Superficial ao longo das 72 horas de experimentação para os ensaios realizados em pH de 6,0 a 10,0, uma vez que, a TS apresentou valor máximo de 36,40 mN/m após 72 h, pH 7,0.

Estudos realizados por Bello *et al.* (2012), na síntese do biossurfactante por *Lactobacillus pentosus* e resíduo da poda de videira, mostrou que o pH foi a variável que teve o maior efeito sobre a superfície ativa. Baixos valores de pH eliminaram as propriedades dos biossurfactantes como também as propriedades bioemulsificantes. Em mesmo estudo, mostraram que em efeito sinérgico com a salinidade e temperatura, para pH maior que 5,5 e salinidade (entre 1 a 5%) não alterou a estabilidade para as propriedades bioemulsificantes do metabólito sintetizado.

Antunes (2010) utilizando o microrganismo *Chromobacterium violaceum* obteve uma excelente estabilidade da tensão superficial nos pHs 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0.

Em estudos realizados por Nitschke e Pastore (2002), observaram que lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* apresentaram-se estáveis a pH maiores que 5 e até 20% de salinidade.

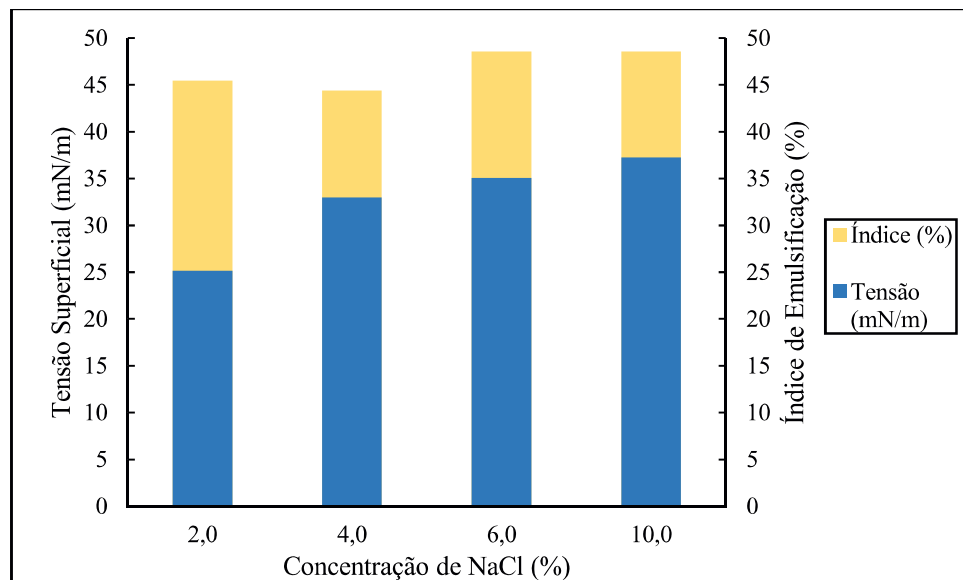
Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram aos resultados apresentados por Bello *et al.* (2012) que observaram a estabilidade físico-química de compostos biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus pentosus*.

4.4 Estabilidade do biossurfactante frente a força iônica

Após diluir o biossurfactante em água destilada contendo uma concentração conhecida de NaCl de 2,0, 4,0, 6,0, e 10,0%, m/v, sua estabilidade foi avaliada através da medida de tensão superficial e índice de emulsificação.

A Figura 7 mostra o resultado da estabilidade produzida do biossurfactante nas variações da concentração de NaCl (%).

Figura 7 – Estabilidade da Tensão Superficial e do Índice de Emulsificação do biossurfactante produzido (48 horas, 28°C, modo cinético) nas concentrações de NaCl 2,0, 4,0, 6,0, e 10,0%



Fonte: Própria (2016).

Portanto, de acordo com a Figura 7, a melhor eficiência tanto para a tensão superficial quanto para o índice de emulsificação é obtida quando o meio está com concentrações de NaCl variando entre 6,0% a 10,0%.

Assim como o resultado das variações de pH apresentadas na Figura 6, não há uma variação tão brusca nos resultados obtidos na Figura 7, mostrando que o biosurfactante produzido apresenta uma boa estabilidade quanto a variações de concentração de NaCl.

Antunes (2010) utilizando o microrganismo *Chromobacterium violaceum* obteve uma excelente estabilidade da tensão superficial em apenas duas concentrações de NaCl de 8,0 e 10,0%, demonstrando resultados significativos nas demais concentrações de NaCl testadas de 2,0, 4,0, 6,0, e 12,0%, com valores de tensão superficial de 30,0 mN/m.

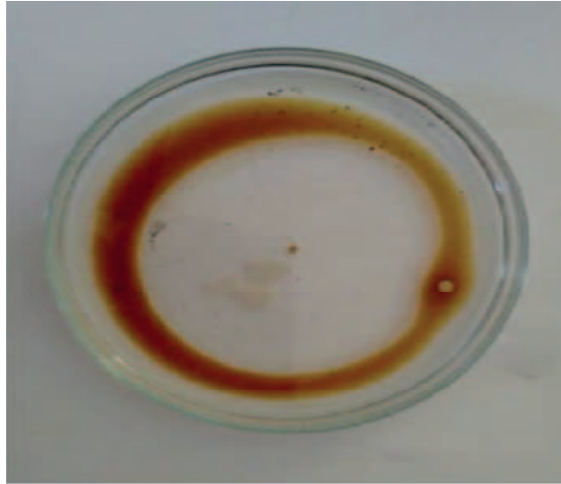
Segundo Bezerra (2012) utilizado a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIA a tensão superficial permaneceu a mesma com a adição de NaCl de 1,0, 5,0 e 10,0% p/v no biosurfactante para cada ponto durante o cultivo avaliado.

Os resultados obtidos nesse trabalho para os biosurfactantes são promissores, uma vez que, uma das vantagens dos biosurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos, baseia-se no fato que esses últimos são sensíveis a salinidade e variação de pH.

4.5 Teste de dispersão

A capacidade de dispersão ou agregação de manchas de petróleo foi simulada no laboratório contaminando-se amostras de água com óleo de motor queimado. Os resultados foram observados visualmente como apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Teste de dispersão do Biossurfactante com óleo de motor queimado



Fonte: Própria (2016).

A formação da zona clara indicou o tamanho da zona de dispersão, a qual foi medida por uma régua com um resultado de 100,8 mm, apresentando assim, uma dispersão do óleo de motor queimado de 72% na água. Portanto, pôde-se observar que o experimento apresentou uma excelente dispersão e uma boa estabilidade durante o processo.

Lima (2013) utilizando culturas de bactérias isoladas selecionadas a partir de sedimentos dos manguezais do Timonha e Icapuí mostrou que os resultados observados no ensaio de dispersão de óleo revelaram biossurfactantes promissores, muitos dos quais promoveram a formação de halos equivalentes ao diâmetro da placa utilizada. Dos isolados que apresentaram apenas um dos genes necessários à síntese da iturina, TIM13 apresentou uma excelente atividade dispersante, apresentando apenas o gene *ituD*. Dos 37 isolados testados, apenas dois não apresentaram atividade de dispersão de óleo e treze (equivalente a 35%) demonstraram potencial para gerar halos do tamanho máximo permitido.

Carvalho (2012) estudou 66 isolados bacterianos quanto à produção de biossurfactantes e, para tanto, utilizou a metodologia da dispersão do óleo, utilizando 100 µl de óleo diesel, para identificar as bactérias mais promissoras. Como resultado, encontrou que todas as linhagens apresentaram a produção de algum halo de dispersão, mas apenas 17 (equivalente a 25%) foram capazes de gerar halos com o diâmetro total da placa de Petri, indicando assim a produção do biossurfactante.

Youssef *et al.* (2004) avaliaram a confiabilidade do método de espalhamento do óleo e o indicaram como um excelente método para a busca por bactérias produtoras de biossurfactantes, estando relacionado com a capacidade de redução da tensão superficial.

4.6 Extração do biossurfactante

O biossurfactante produzido na melhor condição 1 selecionada do planejamento experimental, ou seja, condição que contém 5 gramas de casca de abacaxi e 2 gramas de gordura animal fermentado por 48 horas, devido a menor tensão superficial foi extraído de 1L do líquido metabólico livre de células, seguido de filtração em membrana de millipore e acidificado com uma solução de HCl 5N até atingir o pH 2,0.

Colocou se então para descansar por 16 h e centrifugou o sistema, descartando o sobrenadante e recolhendo o precipitado para ficar na estufa por aproximadamente 37°C por 24 h. A Figura 9 representa o resultado desse isolamento e extração.

Figura 9 – Pó extraído do Biossurfactante utilizando *Serratia marcescens* UCP 1549



Fonte: Própria (2016).

O pó extraído, representado na Figura 9, apresentou $+0,8677\text{g/L}$, representando a quantidade de biossurfactante desidratado obtido em 1L do líquido metabólico.

Segundo o trabalho de Alves *et al.* (2017) durante o cultivo submerso do microrganismo *P. sajour-caju* obteve-se $0,70 \pm 0,03\text{ g/L}$ de biossurfactante desidratado para o experimento utilizando óleo de soja comercial e $0,63 \pm 0,04\text{ g/L}$ para o experimento utilizando óleo de soja residual de fritura.

Velioglu e Urek (2015) obtiveram concentrações de biossurfactantes de $2,8 \pm 0,2\text{ g/L}$; $2,4 \pm 0,2\text{ g/L}$ e $4,0 \pm 0,3\text{ g/L}$ produzidos em cultivo sólido de *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus sajour-caju*, respectivamente. Já, *P. ostreatus* em cultivo sólido, com agitação, produziu $4,7 \pm 0,2\text{ g/L}$ de biossurfactante e sem agitação, $4,1 \pm 0,2\text{ g/L}$.

De acordo com o trabalho de Moraes (2010), a cepa *Bacillus subtilis pGrac-Srfa*, apresentou grande potencial para produção de biossurfactante com um rendimento de 3,0 g/L através da média de três ensaios independentes com um desvio padrão de 0,15 do biossurfactante desidratado. O mesmo estudo utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis* LB5a obteve um resultado de 1,9 g/L do líquido metabólico extraído do biossurfactante desidratado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a eficiência do biopolímero produzido por *S. marcescens* UCP 1549 foi de boa qualidade, uma vez que, utilizando resíduos agroindustriais como a casca de abacaxi e gordura animal, obtiveram-se resultados satisfatórios para a produção do biossurfactante. O biossurfactante produzido apresentou um ótimo potencial de metabolização desses rejeitos industriais como fonte de Carbono e Nitrogênio para seu crescimento gerando assim, insumos com alto valor biotecnológico.

Podemos comprovar então a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido pela bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549 uma vez que esse foi capaz de formar emulsões entre duas fases fluidas que apresentavam diferentes graus de polaridade. Portanto, o biossurfactante produzido tem potencial de aplicação na descontaminação ambiental de petróleo e derivados com um baixo custo.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. P., TAVARES, L. B. B., GERN, R. M. M., SILVA, D. A. K., FURLAN, S. A., WISBECK, E. Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja, **Revista Matéria**, v. 22, n. 03, 2017.

ALVES, T. S.; SALGADO, J. P.; ANDRADE, R. F. S.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; W. FERREIRA, B.; ALMEIDA, M. M.; TAKAKI, G. M.; ARAÚJO, H. W. C. **Production and Evaluation of Biosurfactant by *Serratia marcescens* UCP 1549 Using Industrial Wastes**. Br. Biotechnol. J., v. 4, n. 6, p. 708-719, 2014.

ANDRADE, R. F. S. **Potencial Biotecnológico de *Rhodotorula glutinis* UCP/WFCC 1555 na degradação de derivados do petróleo e na produção simultânea de biossurfactante e β -caroteno**. Tese de doutorado, Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

ANTUNES, A. A. Produção, **Caracterização e Aplicação do Biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo**. Dissertação (Doutorado), 2010 – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. **Biotechnologia Industrial**, vol. 2. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 2001.

ARAÚJO, H. W. C. **Caracterização Morfológica e Molecular de uma Nova Linhagem de *Serratia marcescens* e Potencial Biotecnológico na Produção de Biossurfactantes Prodigiosina e na Utilização de Dibenzotiofeno (DBT)**. Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, p. 150, 2010.

ARAÚJO, H. W. C.; CEBALLOS, B. S. O.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Biosurfactant production by *Chromobacterium prodigiosum***. In Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Singapore, p. 676-681, 2009.

AYED, H. B., JEMIL, N., MAALEJ, H., BAYOUDH, A., HMIDET, N., NASRI, M. **Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6**. Int. Biodeter. Biodegrad. n.99, p.8-14, 2015.

BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced Production of Bioactive Sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by Design of Experiment Approach with Successive Purification and Characterization. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 7, p. 377–386, 2012.

BELLO, X. V.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Study of the Synergistic Effects os Salinity, pH, and Temperature on the Surface- Active Properties of Biosurfactants Produced by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 60, p. 1258-1265, 2012.

BENTO, D. M.; BRAISCH, P.; MACHADO, M.I.; COSTA, J.A.; MARTINS, V. Biorremediação em ambiente impactado com óleo Diesel. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, Blumenau/SC. **A Química como Ciência, Educação e Tecnologia**, Blumenau, 2008.

BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; DE OLIVEIRA FRANCO, L.; DO NASCIMENTO, A.E.; CAVALCANTE, H.M.M.; MACEDO, R.O.; DE CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and Their Physicochemical Characteristics and Cytotoxicity**. *Molecules* 2014, 19, 2771-2792.

BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biosurfactante sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono**. Dissertação (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais), 2012. 125 f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BHARTI, R. K., SRIVASTAVA, S., & THAKUR, I. S. **Extraction of extracelular lipids from chemoautotrophic bacteria *Serratia* sp. ISTD04 for production of biodiesel**. **Bioresource technology**, v. 165, p. 201-204, 2014.

CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO L.A, ALBUQUERQUE C.D. **Environmentally friendly biosurfactants produced by yeasts**. *Adv Exp Med Biol*. 2010, 672, 250-60.

CARVALHO, L. C. T. **Produção de Lipases e biosurfactantes por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal**, 2012. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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

COOPER, D. G. and GOLDENBERG, B. G. **Surface active agents from two *Bacillus* species**, Appl. Environ. Microbiol., v. 53, p 224 –229, 1987.

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

DECESARO, A., RIGON, M.R., THOMÉ, A., COLLA, L.M., 2013. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. Quimica Nova 36, P.C. Martins, V.G. Martins **International Biodeterioration & Biodegradation** 127 (2018) 10–16, 947–954.

GONDIM, J. A. M. et al. **Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2005, vol.25, n.4, pp.825-827.

GRANADA, G. G., ZAMBIAZI, R. C., MENDONÇA, C. R. B. (2004). **Abacaxi: produção, mercado e subprodutos**. 405-422.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, n. 2, p. 148-159, 2001.

IBRAHIM, M.L., IJAH, U.J.J., MANGA, S.B., BILBIS, L.S., UMAR, S., 2013. **Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria**. Int. Biodeterior. Biodegrad. 81, 28–34.

JORGE, N.; SOARES, B. B. P.; LUNARDI, V. M.; MALACRIDA, C. R. **Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras**. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 947-951, 2005.

KONISHI, J.; ONAKA, T.; ISHII, Y.; SUZUKI, M. **Demonstration of carbon sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. Strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene**. FEMS Microbiology Letters, 187, p. 151-154, 2000.

KOSARIC, N., CAIRNS, W. L. **Biosurfactants and biotechnology**. New York: Marcel Dekker,. 1987. p. 21-46 e 47-88.

KUYUKINA, M.S, IVSHINA I.B., PHILP J.C, CHRISTOFI N, DUNBAR S.A, RITCHKOVA, M.I. **Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction**. J Microbiol Met 46: 109-120.2001.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico, texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LAWNICZAK, L., MARECIK, R., CHRZANOWSK, L. **Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013, 97, 2327-2339.

LI, J., DENG, M., WANG, Y., CHEN, W., 2016. **Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoides* BS6 utilizing soybean oil waste**. Int. Biodeterior. Biodegrad. 112, 72–79.

LIMA, L. B. **Frequência de bactérias produtoras de biosurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará**, 2013. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., BANAT, I.M., 2011. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production**. AMB Exp. 1, 1e19.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin J. **Sci. Technol.**, 2005.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012.

MARTÍNEZ, O.; DíEZ, C.; MILES, N.; SHAH, C.; MORÁN, A. **Biodesulfurization as a complement to the physical cleaning of coal.** *Fuel*. 82:1085-1090.2003.

MARTINS, P. C., MARTINS, V. G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint, **International Biodeterioration & Biodegradation** n.127, p.10-16, 2017.

M.L. IBRAHIM, U. IJAH, S. MANGA, L. BILBIS, S. UMAR, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 81 (2013) 28.

MORAES, D. T. **Produção do Lipopeptídeo Surfactina a partir de uma cepa de *Bacillus Subtilis* com o Operon *srfA* sob controle do promotor regulado *Pgrac*.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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

NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. (1995) **Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*.** *Applied and Environmental Microbiology*.

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.

NISTCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Revista Química Nova**, Campinas, vol.25, n.5, p. 772 – 776, 2002.

OKORO, C. C. Microbial degradation of hydrocarbons in produced water from crude oil production operations in Escravos tank farm. **PhD. Thesis**, p. 269, 1999.

OKORO, C.; AGRAWAL, A; CALLBECK, C. Simultaneous biosurfactant production and hydrocarbon biodegradation by the resident aerobic bacterial flora of oil production skimmer pit at elevated temperature and saline conditions. **Life Science Journal**, v. 9, n. 3, p. 356-364, 2012.

- PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**, 2006. Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- RODRÍGUEZ, D. M. **Potencial biotecnológico de *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 na degradação de combustíveis, na produção de lipídeos e de biossurfactante**. 2015. Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.
- ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and interfacial phenomena**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.
- ROSETO, N.; PIMENTA, A.; DUGARTE, F.; CARVAJAL, F. Parameters examination a biosurfactant production at laboratory scale. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 2, p. 35-42, 2003.
- RUFINO, R. D. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, jan. 2014.
- SAJNA, K. V. Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 85-92, set. 2013.
- SANIBAL, E. A. A.; FILHO, J. M. **Alterações Físicas, Químicas e Nutricionais de Óleos Submetidos ao Processo de Fritura**. *Foods Ingrid*, v. 18, p.64, 2002.
- SANTOS, L. Q. *et al.* **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivados do petróleo**. *Exacta*, v.8, n.2, p. 201- 210, 2010.
- SILVA, A. P. M. da; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. de A. R. **Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, n.1, p. 38-43, 2014.

SILVA, R. C. F. S. **Resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo.** Dissertação de Mestrado, Recife. Universidade Católica de Pernambuco: [s.n.], 2012, p.149.

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

SINGH, V. Biosurfactant–Isolation, Production, Purification & Significance. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 7, p. 2250-3153, 2012.

SOARES, D. W. S. **Produção e Caracterização de Biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará – Brasil).** Tese de Doutorado em engenharia química – Centro de Tecnologia, 2014. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R. M. **Biosurfactants: a general overview.** In *Biosurfactants*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2011. 1-11 p.

UZOIGWE, C.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. Production of Biosurfactants Using Eco-friendly Microorganisms. **In Environmental Sustainability**, p. 185-204, 2015.

VELIOGLU, Z., UREK, R.O. “Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solidstate fermentation systems”, **Turkish Journal of Biology**, v. 39, n.1, pp. 160-166, 2015.

WONGSA, P; TANAKA, M, UENO, A; HASANUZZAMAN, M; YUMOTO, I; OKUYAMA, H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene diesel oil, and lubricating oil. **Curr Microbiol**, v. 49, n. 415-422, 2004.

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

ZANA, R. **Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, micro emulsions, vesicles, and lyotropic phases.** (Surfactant science series; v. 125) New York: CRC Press, p. 539, 2005.