



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Ana Paula Melo Bione

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
***Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 UTILIZANDO**
SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS E MONITORAMENTO
COMPUTORIZADO DA TEMPERATURA

Recife

2019

Ana Paula Melo Bione

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE POR
Syncephalastrum racemosum UCP 1302 UTILIZANDO
SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS E MONITORAMENTO
COMPUTORIZADO DA TEMPERATURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Dra. Galba Maria Campos Takaki

Co-orientador: Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima Filho

Recife

2019

Bione, A. P. M.

Produção de biossurfactante por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 utilizando substratos agroindustriais e monitoramento computadorizado da temperatura, 2019, 85.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

1. *Syncephalastrum racemosum*. 2. Substratos agroindustriais 3. Monitoramento computadorizado. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTATE POR *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 UTILIZANDO
SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS E MONITORAMENTO COMPUTORIZADO DA TEMPERATURA

ANA PAULA MELO BIONE

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
(Orientadora)

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Titular Interno)

Prof. Dr. Profa. Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba- UEPB
(Titular Externo)

Suplentes:

Profa. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
(Suplente Interno)

Profa. Dra. Celluta Sales Alviano
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ
(Suplente Externo)

Defendida em 22/02/2019

Coordenadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus pela força, saúde, sabedoria e discernimento concedido.

A minha incentivadora orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pela sabedoria, humanidade, paciência, exigências com a organização e execução dos experimentos e oportunidades a mim concedidas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra Lima pelo prestatividade, disponibilidade e ajuda indispensável para a construção deste trabalho de forma profissional.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubem de Ferreira, pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), pela oportunidade e uso da infraestrutura para a realização dos experimentos.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, pelo companheirismo e apoio, em especial, Marcos Luna, Dayana Montero, Roseleide Fontenele, Thayse Alves, Davi Cavalcanti, Adriana Souza e Patrícia Maia.

Aos técnicos Sr. Severino Humberto de Almeida, André Felipe e a Sra. Sônia Maria de Souza, pelo apoio.

Aos professores de Mestrado da Universidade Católica de Pernambuco, em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves pelos ensinamentos e apoio.

A minha família pelo amor, carinho e apoio a mim concedidos em todos os momentos.

A minha amiga Amanda Barbosa Lins, por toda amizade, paciência e força oferecidos durante a vida.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa e pelo fomento à pesquisa, para realização deste trabalho.

A todos que direta e indiretamente, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
1.3 Revisão da Literatura	18
1.3.1 Surfactantes.....	18
1.3.2 Biossurfactantes	20
1.3.3 Comparação entre biossurfactantes e surfactantes sintéticos.....	21
a) Biodegradabilidade	21
b) Diversidade Química	21
c) Biocompatibilidade e baixa toxicidade.....	21
d) Disponibilidade de matéria-prima para uma síntese	21
e) Uso em controle ambiental	22
f) Elevada eficácia em condições extremas	22
g) Maior eficiência e efetividade.....	22

1.3.4 Emulsificantes.....	22
1.3.5 Estabilidade das emulsões	25
1.3.6 Bioemulsificantes	27
1.3.7 Micro-organismos produtores de Bioemulsificantes	29
1.3.8 Importância e função fisiológica dos Bioemulsificantes para os microrganismos ..	30
1.3.9 Fatores que influenciam a produção de Bioemulsificantes.....	32
1.3.10 Classificação dos Biossurfactantes/ Bioemulsificantes.....	33
a) Glicolípídeos	35
b) Lipoproteínas ou Lipopeptídeos.....	37
c) Ácidos graxos, fosfolípídeos e espécies neutros.....	37
d) Surfactantes/Emulsificantes poliméricos.....	38
e) Surfactantes/Emulsificantes Particulados	39
1.3.11 Produção de Bioemulsificantes	39
1.3.12 Substratos Agroindustriais	39
1.3.12.1 Óleos de fritura	40
1.3.12.2 Milhocina.....	40
1.3.12.3 Manipueira	41
1.3.13 Aplicações dos biossurfactantes e bioemulsificantes	41
1.3.13.1 Biossurfactantes e Bioemulsificantes em processos de biodegradação	41
1.3.13.2 Biossurfactantes na indústria farmacêutica	42
1.3.13.3 Bioemulsificantes na indústria de pesticidas	42
1.3.13.4 Biossurfactantes na indústria de alimentos	43
1.3.14 História do Arduíno	44
1.3.15 Estrutura do Arduíno	44
1.3.15.1 Hardware.....	45
1.3.15.2 Software.....	45
1.3.15.3 Aplicação.....	46

Bione, A. P, M. Produção de biossurfactante por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302

1.4 Referências Bibliográficas 49

CAPÍTULO II – Artigo científico.....56

CAPÍTULO III

Conclusões Gerais 82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação esquemática dos surfactantes catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C) e não iônicos (D). A cauda corresponde à porção apolar e a cabeça à porção polar.	18
Figura 2. Ilustração esquemática do agente tensoativo e formação da micela.	19
Figura 3. Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (concentração micelar crítica CMC).	19
Figura 4. Característica anfifílica do emulsificante.....	22
Figura 5. Tipos de emulsificantes.	23
Figura 6. Atividade do emulsificante iônico O/A e atividade do emulsificante não-iônico A/O (B).	24
Figura 7. Esquema dos possíveis mecanismos de desestabilização da emulsão.	26
Figura 8. Estrutura do biossurfactante/bioemulsificante L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β – hidroxidecanoato.	35
Figura 9. Estrutura do biossurfactante/bioemulsificante dimicolato trealose.	36
Figura 10. Estrutura do biossurfactante/bioemulsificante soforolípido ácido.	36
Figura 11. Estrutura da surfactina.	37
Figura 12 - Estrutura do biossurfactante fosfatidiliositol.....	38
Figura 13. Estrutura do biossurfactante Emulsan.	38
Figura 14. Componentes da plataforma arduíno.	45

CAPÍTULO II

Figura 1. Monitoramento computadorizado da fermentação através do Arduino Uno61	
Figura 2. Sensor DS18B20 submerso na fermentação por <i>C. phaeosphaera</i> e isolado62	
Figura 3. Curva de Calibração para determinação de carboidratos.64	
Figura 4. Diagrama de Pareto para determinar a influência dos resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina) na produção do bioemulsificante.....	66
Figura 5. Gráfico de superfície resposta para análise da tensão superficial (A) milhocina X óleo de soja pós-fritura; (B) óleo de soja pós-fritura X maipueira; (C) milhocina X manipueira.67	

Figura 6. Diagrama de Pareto para determinar a influência dos resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina) na produção do bioemulsificante..69

Figura 7. Gráfico de superfície resposta para análise do índice de emulsificação: (A) milhocina X óleo de soja pós-fritura; (B) óleo de soja pós-fritura X maipueira; (C) milhocina X manipueira69

Figura 8. Curva de crescimento do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1551 através da biomassa avaliando o pH e o índice de emulsificação (A-21°C, B-28°C, C-35°C). Curva de crescimento do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1551 através da biomassa avaliando o pH e a tensão superficial (D-21°C, E-28°C, F-35°C).70

Figura 9. Influência da temperatura e tempo de fermentação na produção do biossurfactante (A) e do bioemulsificante (B).71

Figura 10. Observações microscópicas das gotas formadas a partir do bioemulsificante após 24 h: (A) líquido metabólico do ensaio 3 com emulsão formado com óleo de motor queimado e (B) Surfactante Químico (SDS) com emulsão formada a partir do óleo de motor queimado.72

Figura 11. A estabilidade do bioemulsificante produzido por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 de acordo com o índice de emulsificação (IE24): pH (A); NaCl (B); e temperatura (C). 74

Figura 12. Concentração micelar crítica do bioemulsificante produzido por *Syncephalastrum racemosum* em comparação com o surfactante sintético (SDS).75

Figura 13. Microscopia óptica da fibra do Fibra do Poliéster com água (A),Bioemulsificante (B) e Biossurfactante (C), Fibra do poliéster seca (D).76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação, exemplo e produção mundial dos surfarfactates/bioemulsificante.....	28
Tabela 2. Principais tipos de bioemulsificantes e micro-organismos produtores.....	29
Tabela 3. Fungos produtores de bioemulsificantes.....	30
Tabela 4. - Biossurfactantes produzidos por micro-organismo.....	34

CAPÍTULO II

Tabela 1. Planejamento fatorial DCCR 2 ³	61
Tabela 2. Tensão superficial de acordo com o planejamento fatorial, DCCR 2 ³ , utilizando <i>Syncephalastrum racemosum</i> após 96 h de cultura sob agitação.....	65
Tabela 3. Planejamento fatorial DCCR de 23 para avaliar a influência do óleo de soja pós-fritura e da milhocina na produção de um bioemulsificante por <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP1302, avaliados durante 24 h pelo índice de emulsificação E24 (%).	68

RESUMO

Biossurfactantes são compostos de superfície ativa produzidos por micro-organismos, constituídos por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, com potencial de reduzir a tensão superficial e interfacial da água e ou de formar emulsões a partir de líquidos com duas fases, e que têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura, estabilidade, entre outros. Neste sentido, investigações foram realizadas com *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 avaliando a temperatura ideal para produção simultânea de biossurfactante e bioemulsificante, empregando monitoramento digital computadorizado, através de plataforma do arduino e o sensor de temperatura à prova d'água DS18B20. A bioconversão de resíduos renováveis (óleo de soja residual, manipueira e milhocina) por *S. racemosum* foi estudada aplicando um planejamento experimental do DCCR de 2³, tendo como variável resposta produção de biossurfactante e ou bioemulsificante. Os resultados obtidos demonstraram que o *S. racemosum* UCP 1302 produziu biossurfactante no ensaio 7 (3,5% de milhocina, 6,5% de óleo de soja residual e 3,5% de manipueira), reduzindo a tensão superficial da água de 72 para 30,9 mN/m. A maior produção de bioemulsificante foi observada no ensaio 3 (6,5% de milhocina, 6,5% de óleo de soja residual e 3,5% de manipueira), apresentando índice de emulsificação de 97,58%. A composição bioquímica preliminar do biosurfactante mostrou ser um composto constituído de lipídios (53,56%) e proteínas (37,88%), com valores reduzidos de carboidratos (8,56%). O bioemulsificante apresentou na sua composição proteínas (45,72%) e lipídios (42,19%), com baixo valor de carboidratos (12,09%), sugerindo que ambos biossurfactante e bioemulsufucante apresentam características de lipopeptideos. Ambas as biomoléculas demonstraram caráter aniônico, com uma concentração micelar crítica (CMC) de 2,5%. As biomoléculas foram avaliadas e mostraram eficiência quanto ao tamanho das partículas, viscosidade, estabilidade às variações de pH, concentração de NaCl e temperatura, além de excelente capacidade como agente molhante, indicando possível aplicabilidade para o processo de Recuperação Melhorada do Petróleo (MEOR). *S. racemosum* apresentou excelente capacidade de produção de bioemulsificantes, como também a capacidade de produção de biossurfactantes, utilizando conversão metabólica de resíduos agroindustriais, tornando o bioprocesso viável e com potencial na aplicação biotecnológica.

Palavras-Chave: Bioprocesso, Arduino, Surfactante, Fungo Filamentoso, Biorremediação.

ABSTRACT

Biosurfactants are active surface compounds produced by microorganisms, consisting of a hydrophilic and a hydrophobic portion, with the potential to reduce the surface and interfacial tension of the water and to form emulsions from two-phase liquids, which have received increasing interest in the last decades for the advantages such as biodegradability, low toxicity, production from renewable sources, functionality under extreme conditions of pH and temperature, stability, among others. In this sense, investigations were carried out with *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 evaluating the ideal temperature for the simultaneous production of biosurfactant and bioemulsifier, using computerized digital monitoring, through the arduino platform and the temperature sensor DS18B20. The bioconversion of renewable residues (residual soybean oil, manípueira and maize) by *S. racemosum* was studied by applying an experimental design of the DCCR of 23, having as a variable response biosurfactant and / or bioemulsifier production. The results showed that *S. racemosum* UCP 1302 produced biosurfactant in assay 7 (3.5% maize, 6.5% residual soybean oil and 3.5% mango), reducing the water surface tension of 72 to 30.9 mN / m. The highest production of bioemulsifiers was observed in assay 3 (6.5% of cornicene, 6.5% of residual soybean oil and 3.5% of mango), with an emulsification index of 97.58%. The preliminary biochemical composition of the biosurfactant was composed of lipids (53.56%) and proteins (37.88%), with reduced carbohydrate values (8.56%). The bioemulsifier presented proteins (45.72%) and lipids (42.19%), with a low carbohydrate value (12.09%), suggesting that both biosurfactant and bioemulsifante have lipopeptide characteristics. Both biomolecules showed anionic character, with a critical micellar concentration (CMC) of 2,5%. The biomolecules were evaluated for efficiency in terms of particle size, viscosity, stability to pH variations, NaCl concentration and temperature, as well as excellent wetting capacity, indicating a possible applicability to the Improved Oil Recovery (MEOR) process. *S. racemosum* presented excellent bioemulsifiers production capacity, as well as biosurfactant production capacity, using metabolic conversion of agroindustrial residues, making the bioprocess viable and with potential in the biotechnological application.

Key Words: Bioprocess, Arduino, Surfactant, Filamentous Fungus, Bioremediation.

Capítulo I

1.1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial dos surfactantes atingiu cerca de 30,65 bilhões de dólares em 2015, e estima-se que a demanda mundial de surfactantes atingirá 39,69 bilhões de dólares até o ano de 2021. A maior parte dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo; entretanto, a crescente preocupação ambiental entre os consumidores associado às novas legislações de controle do meio ambiente, tem levado procurar por surfactantes naturais, como alternativa aos produtos existentes (ACMITE, 2013; GUIDI et al., 2018).

Os surfactantes químicos derivados de petróleo são estruturas moleculares anfifílicas, ou seja, a mesma molécula possui uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica, e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de lipofílica ou hidrofóbica. Em função dessas características, os surfactantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão (SOUZA et al., 2015; PUNNIYAKOTTI, 2017).

Os biosurfactantes são compostos de origem microbiana com várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos. As moléculas anfipáticas com diferentes graus de polaridade, o que significa que podem ser usadas para reduzir a tensão superficial e formar emulsões onde o hidrocarboneto pode ser solubilizado em água e é assim chamado um bioemulsificante (UZOIGWE et al., 2015; MAIA et al., 2018).

Os termos biosurfactantes e bioemulsificantes foram utilizados com referência ao mesmo nível de bioatividade. No entanto, compostos de elevado peso molecular e capazes de formar e estabilizar emulsões são referidos como bioemulsionantes ou bioemulsantes. Estes são polímeros de polissacarídeos, lipo-polissacarídeos, proteínas e lipoproteínas, enquanto os biosurfactantes são representados por compostos de baixo peso molecular, dentre os quais estão incluídos lipopeptídeos e glicolipídios (FRANZETTI et al., 2012; SOUZA et al., 2016; PUNNIYAKOTTI, 2017).

Os compostos anfifílicos ambientais extracelulares: biosurfactantes e bioemulsificantes são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, principalmente, por bactérias, seguido de leveduras e de forma mais escassa por fungos filamentosos. Esses compostos tensoativos apresentam diferentes estruturas químicas e em condições extremas, como temperatura, pH e salinidade, demonstrando diferentes funções e aplicações. Neste sentido, justificam-se as inúmeras aplicações em diferentes setores industriais, tais como, de cosméticos, alimentos, detergentes, agricultura e medicina, sendo sua biodegradabilidade, um dos seus atributos mais importantes, pois evita problemas de toxicidade e acumulação nos

ecossistemas naturais. (SEKHON-RANDHAWA et al.,2014; DECESARO et al., 2015; SANTOS et al., 2016, MAIA et al. 2018).

No entanto, os biossurfactantes ainda não permitem uma competitividade com os emulsificantes químicos, pois seu custo de produção ainda é elevado em função da utilização de substratos, que elevam os custos acima de 30 a 40% do seu valor. Assim, o sucesso no desenvolvimento industrial da produção de biossurfactantes depende do uso de substratos alternativos e de baixo custo, empregando resíduos agroindustriais, tornando-se assim uma importante estratégia para redução dos custos de produção (SILVA, 2012; ARAÚJO, 2016; SATPUTE et al., 2017).

Assim, o aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais vem se apresentando como uma alternativa atrativa para exploração, como fonte nutricional para a produção de insumos de elevado valor agregado. Neste contexto, os resíduos de natureza hidrofílica são considerados vantajosos, tendo em vista a possibilidade de bioconversão por fungos filamentosos o que possibilita maior rendimento de bioprodutos (MONTERO-RODRÍGUEZ, et al., 2016).

Além das fontes nutricionais, para atingir um maior rendimento do biossurfactantes é necessário empregar estratégias para encontrar condições mais eficiente processos. Para um eficiente processo fermentativo e posterior otimização é necessário conhecer pH, aeração, temperatura e tamanho do inóculo ótimos para o desenvolvimento do micro-organismos (FRANCO e LANDGRAF, 2003; CERQUEIRA, 2007; BEZERRA, 2012; CHEN et al 2015; ROCHA, 2017).

Neste sentido, considera-se a temperatura um fator físico importante na produção de biossurfactantes e bioemulsificantes, ativando as vias metabólicas na utilização dos substratos hidrofílicos e ou hidrofóbicos (FONTES et al., 2012). Portanto, o caráter inovador do monitoramento da temperatura computadorizado empregando Arduíno, contribuirá para o conhecimento da melhor temperatura no processo de produção do biossurfactantes, tornando o micro-organismo mais eficiente no uso dos substratos agroindustriais.

O Arduíno trata-se de uma placa de microcontrolador que pode ser energizada por um computador, através do plugue USB (universal serial bus) que permite a ligação com um computador ou por uma bateria de 9 V, ou ainda, por uma fonte de alimentação. O Arduíno recebe a programação realizada no seu software (plataforma digital), através de um computador, após envio de dados a informação memorizada e pode realizar a função independentemente de estar conectado a um computador (MONK, 2015).

Os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, e dessa forma, aceleram a degradação de vários óleos por micro-organismos e promovem a biorremediação de águas e solos (LIMA, 2016).

A biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos presentes ou adicionados no local de contaminação (BERNOTH et al., 2000). Onde os biossurfactantes e bioemulsificantes, ao serem excretados durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e a translocação de substratos insolúveis através da membrana celular. Estes biotensoativos podem ser encontrados como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas, ou ficarem aderidos à superfície dessas células com a função de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade das substâncias hidrofóbicas (MARIANO et al., 2006; CAMEOTRA e SINGH, 2009; CÂMARA, 2016).

Assim, a proposta de investigação do potencial biotecnológico do fungo filamentosso *Syncephalastrum racemosum* na produção de biossurfactantes e bioemulsificante está fundamentada na utilização de recursos renováveis como substratos, bem como sua conversão em produtos com elevado valor agregado e de baixo custo. Adicionalmente, considera-se ainda, o uso de tecnologia inovadora com o uso do Arduíno, como um microcontrolador do bioprocessamento de produção do biossurfactante, além da aplicação na biorremediação de poluentes hidrofóbicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial biotecnológico do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 na produção de bioemulsificante, utilizando resíduos agroindustriais como substratos alternativos (milhocina, manipueira e óleo de soja pós-fritura) por meio de monitoramento computadorizado da temperatura.

1.2.2 Objetivos Específicos

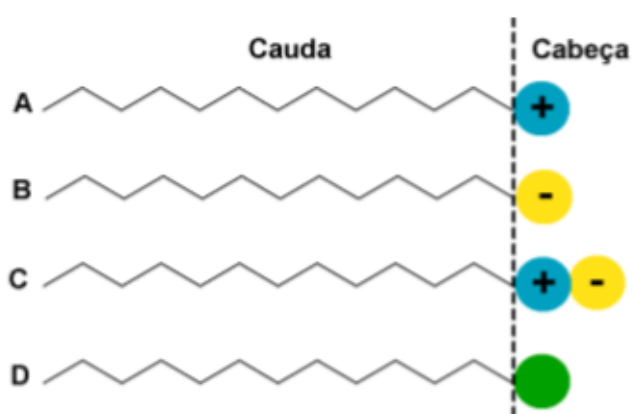
- Investigar o uso de diferentes substratos agroindustriais como fontes de Carbono e Nitrogênio na produção do bioemulsificante;
- Utilizar diferentes concentrações dos resíduos agroindustriais, utilizando um planejamento fatorial, visando à maximização da produção de bioemulsificante
- Produzir bioemulsificante a partir da cepa de *Syncephalastrum racemosum*;
- Realizar a produção do bioemulsificante com os resíduos e concentrações selecionadas, utilizando óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina, sob diferentes temperaturas usando o Arduino e o sensor DS18B20, empregando planejamento delineamento central composto rotacional (DCCR 2³);
- Avaliar os índices de emulsificação e dispersão, a estabilidade e a tensão superficial.
- Isolar e purificar o bioemulsificante produzido por *S. racemosum*;
- Caracterizar o bioemulsificante através de métodos físicos e químicos;
-
- Avaliar estatisticamente os resultados obtidos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Surfactantes

Tensoativos ou surfactantes (contração do termo surface active agent) são compostos orgânicos anfipáticos que apresentam em sua molécula uma porção polar e outra apolar. A porção apolar, também denominada de cauda, é constituída por uma ou duas cadeias carbônicas, ou fluorocarbônicas, ou siloxânicas. Enquanto a porção polar, ou cabeça, pode apresentar grupos iônicos (cátions ou ânions), não iônicos ou anfóteros, que se comportam como ácido ou base dependendo do pH do meio (Figura 1) (DALTIM, 2011; FELIPE et al., 2017).

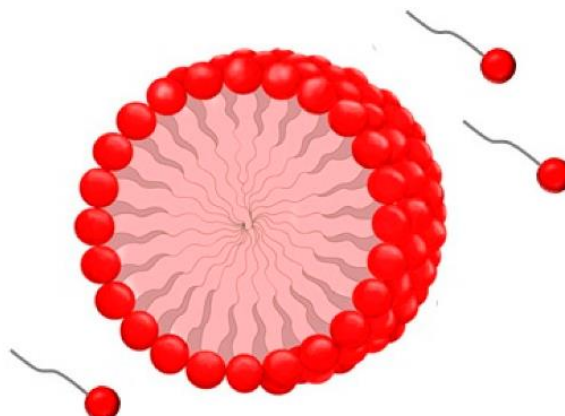
Figura 1. Representação esquemática dos surfactantes catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C) e não iônicos (D). A cauda corresponde à porção apolar e a cabeça à porção polar.



Fonte: DIAS et al., 2017.

Quando a concentração de surfactante no meio atinge uma faixa estreita específica, chamada concentração micelar crítica (CMC), as moléculas tendem a se autoassociar com as caudas agregando-se para dentro em uma estrutura micelar montada que é favorecida termodinamicamente em solventes polares. As micelas formadas têm um centro de porção hidrofóbica (cauda) e uma porção de cabeça externa (hidrofílica), ocorre em uma fase contínua geralmente observada em fase aquosa (Figura 2). Por outro lado, quando a porção externa das micelas é composta pela porção da cauda (hidrofóbica) e a porção da cabeça montada no centro das micelas é chamada de micela reversa que é formada na fase oleosa (YOUNG, 2013; RUCKENSTEIN, 1975; BHAISARE, 2015).

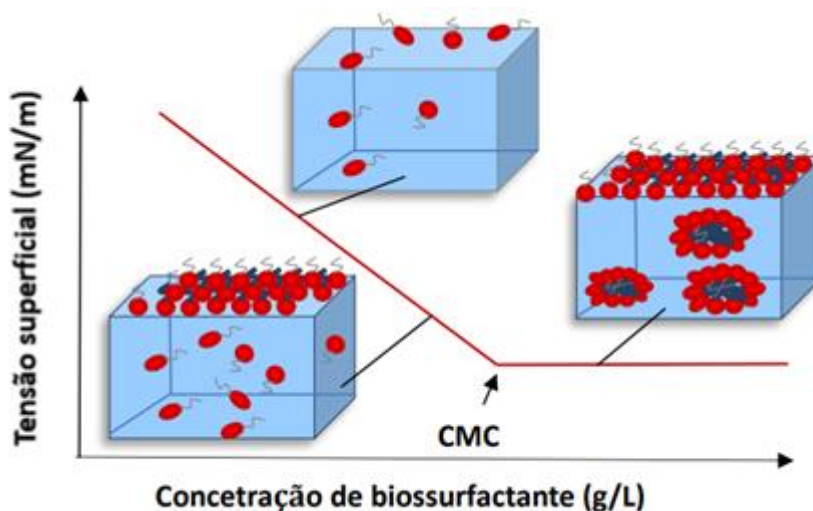
Figura 2. Ilustração esquemática do agente tensoativa e formação da micela.



Fonte: SANTOS et al., 2016.

As propriedades do surfactante dependem da sua concentração até a obtenção da concentração micelar crítica (CMC). Acima da CMC, as moléculas de monômero do surfactante se associam para formar micelas, bicamadas e vesículas (Figura 3). Essa propriedade permite que os surfactantes minimizem a tensão superficial e interfacial e aumentem a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos orgânicos não polares. O CMC é geralmente usado para medir a eficiência do surfactante. Tensoativos mais eficientes têm menor CMC, ou seja, menos surfactante é necessário para diminuir a tensão superficial (DESAI; BANAT, 1997; WHANG et al., 2008; DE et al., 2015).

Figura 3. Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (concentração micelar crítica CMC).



Fonte: SANTOS et al., 2016.

A maioria dos surfactantes produzidos é quimicamente são derivados do petróleo. No entanto, os agentes tensoativos sintéticos são geralmente tóxicos e difíceis de decompor através da ação de micro-organismos. Nos últimos anos, tais problemas têm motivado a comunidade científica a buscar surfactantes mais amigos do meio ambiente, como os obtidos pela produção microbiana, conhecidos como biossurfactante. Além disso, as preocupações com o meio ambiente por parte dos consumidores e a nova legislação de controle ambiental levaram ao desenvolvimento de surfactantes naturais como uma alternativa aos produtos existentes (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015; SANTOS et al., 2016).

1.3.2 Biossurfactantes

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes como a diminuição da tensão superficial e a capacidade emulsificante são chamados de biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais e apresentam inúmeras vantagens em relação aos compostos químicos, entre elas a alta atividade superficial e interfacial, tolerância à temperatura, pH e força iônica, alta biodegradabilidade na água e no solo e baixa toxicidade (BOGNOLO, 1998; LIN, 1996; BANAT et al., 2010). Tem-se observado um grande aumento do interesse nesses produtos devido às suas características sustentáveis (MAKKAR et al., 2011).

Podem ser classificados de acordo com a sua origem microbiana e composição química, sendo que as principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993; DESAI; BANAT, 1997; BANAT et al. 2000). A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção, pH do produto, tamanho das partículas do substrato, permeabilidade do composto, composição dos indutores, substratos e CMC. (FONTES et al., 2008; CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009). Esses produtos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, por meio de processos de fermentação (BUENO et al, 2010).

Apesar das inúmeras vantagens desses tensoativos frente aos compostos químicos, um grande problema ainda está relacionado com o aumento de escala de produção e barateamento da produção. O biossurfactante surfactina, produzido pela empresa “Sigma Chemical Company”, custa aproximadamente 153 dólares o frasco contendo 10 mg. Este valor é ainda muito elevado,

quando comparado ao surfactante químico, que custa aproximadamente dois dólares por kilo (MAKKAR et al., 2011). Segundo Kosaric e colaboradores (1984) este barateamento deve ser focado na seleção de microrganismos, adaptados ao processo ou geneticamente modificados para este fim; adaptações do processo para que possua baixos custos de aplicação e manutenção; seleção de substratos de baixo custo para o crescimento microbiano e utilização de metodologias de extração e purificação do bioproduto com baixo custo (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Czaplicka e Chmielarz (2009) propõem três principais mecanismos de ação dos biossurfactantes: aumento da área superficial de substratos hidrofóbicos para o crescimento microbiano; aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos por meio do aumento da solubilidade aparente, ou adsorvendo-os nas superfícies, e regulação do ataque de microrganismos às superfícies dos substratos.

1.3.3 Comparação entre biossurfactantes e surfactantes sintéticos

Os biossurfactantes apresentam características que representam vantagens sobre os surfactantes sintéticos, são elas:

a) Biodegradabilidade

Os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna para aplicações como biorremediação, tratamento de resíduos e derramamento de óleo (Whanga et al., 2008; Das & Mukherjee, 2007; Kosaric, 2001).

b) Diversidade química

Os biossurfactantes têm uma grande variedade de compostos de superfície ativa com propriedades intimamente relacionadas com as aplicações específicas (Gautam & Tyagi, 2006).

c) Biocompatibilidade e baixa toxicidade

O aumento de preocupação da população com os alérgicos dos produtos as biossurfactantes têm sido desenvolvidas por leveduras, possuem baixa toxicidade, O uso de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Cohen et al., 2010; Kosaric, 2001; Cameotra & Makkar, 1998).

d) Disponibilidade de matéria prima para uma síntese

Os biotensoativos podem ser sintetizados a partir de fontes inesgotáveis de primas de baixo custo (Rahman et al., 2002), os resíduos agroindustriais, sendo de interesse particular para uma produção em grande escala (ex: indústria do petróleo).

e) Uso em controle ambiental

Biossurfactantes podem ser usados de forma eficiente na manipulação de emulsões industriais, controle de vazamentos de petróleo, biodegradação, e desintoxicação de efluentes industriais e na biorremediação (Franzetti et al., 2006; Noordman e Janssen, 2002).

f) Elevada eficácia em condições extremas

Em condições de alta temperatura, salinidade ou variações de pH, os biossurfactantes geralmente não perdem sua capacidade de emulsionar ou de reduzir a tensão superficial do meio. Alguns tensoativos biológicos são capazes de suportar concentração de até 10% de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes químicos convencionais (Bognolo, 1999).

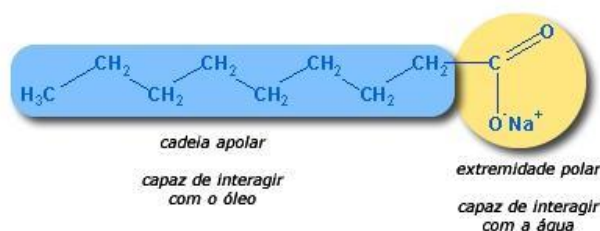
g) Maior eficiência e efetividade

Os biossurfactantes são os menores superficiais em menores quando comparado aos surfactantes sintéticos (Cooper & Paddock, 1984).

1.3.4 Emulsificantes

O mercado global de emulsificante está destinado a atingir 2,3 milhões de toneladas em 2018, devido ao uso considerável de emulsificantes em alimentos e bebidas, e pelo uso crescente em produtos de cosméticos. Os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos também vêm impulsionado o crescimento da utilização desse. Todos os emulsificantes são moléculas anfifílicas (Figura 4), ou seja, a mesma molécula possui uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica, e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de lipofílica ou hidrofóbica (Figura 1). Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo que elas se misturem formando a emulsão (CERQUEIRA e COSTA, 2009; FOOD INGREDIENTS BRASIL 2013; SOUZA et al., 2016).

Figura 4. Característica anfifílica do emulsificante

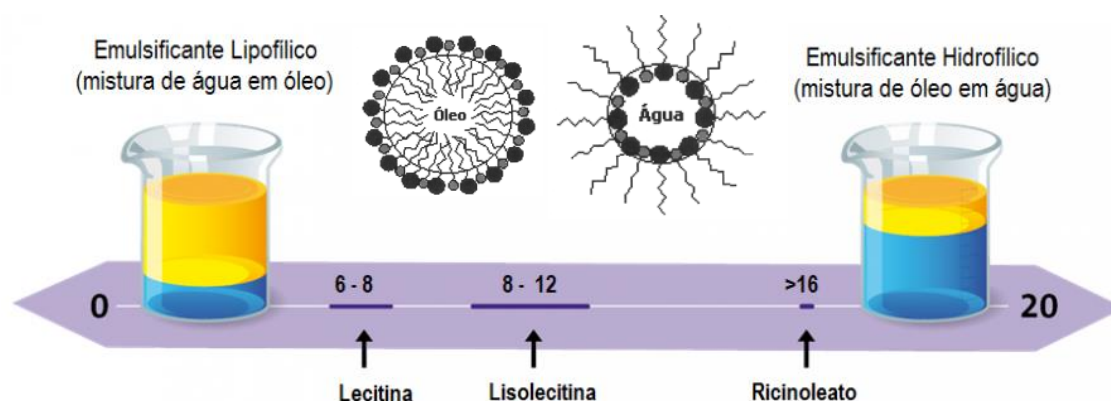


Fonte: Santos et al. (2008).

A sua solubilidade em óleo é conferida pela cadeia carbônica enquanto que o grupo polar, por sua afinidade com a água, é capaz de formar uma cadeia carbônica e produzir uma solução aquosa. Quando estas substâncias são colocadas em meio óleo-água ou água-ar elas se orientam de modo manter os grupos hidrofílicos na fase aquosa e as cadeias carbônicas na fase oleosa, conforme a figura 5. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão (CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; INÈS- DHOUHA, 2015; UZOIGWE, 2015; SHARMA et al., 2016).

Os emulsificantes podem agir como emulsificante lipofílico formando emulsões nas misturas de água em óleo e como emulsificante hidrofílico formando emulsões nas misturas de óleo em água, conforme a figura 5.

Figura 5. Tipos de emulsificantes.



Fonte: Van der Graaf, 2016.

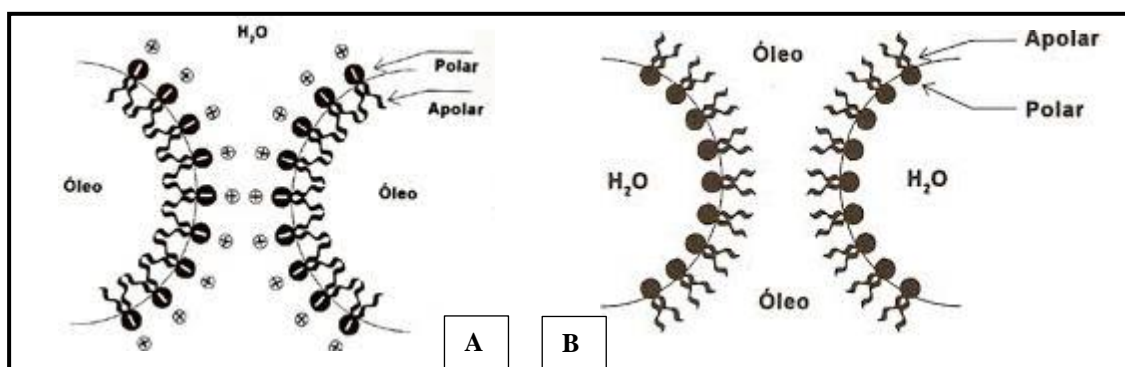
Os agentes emulsificantes são moléculas que ao serem adicionadas às emulsões aumentam a sua estabilidade cinética tornando-as razoavelmente estáveis e homogêneas, sendo a emulsão um sistema coloidal disperso no qual as fases são líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis (OLIVEIRA et al., 2004; FRANGE; GARCIA, 2009; CAMPOS et al., 2013). Em quase todas as emulsões uma das fases é água (fase contínua) e a outra é um líquido não miscível chamado de óleo (fase dispersa) e os glóbulos do líquido disperso apresentam, geralmente, diâmetros entre 0.1 μm e 10 μm . Se o óleo for a fase dispersa, a emulsão é chamada emulsão óleo em água (O/A); se o meio aquoso for a fase dispersa, é chamado de emulsão de água em óleo (A/O) (SHAW, 1975; KALE, 2017).

Análises internacionais do mercado indicam que a Europa, a Ásia-Pacífico e os Estados Unidos detêm a maior parte do mercado global de emulsificantes. Nos próximos anos, é a região Ásia-

Pacífico que deverá apresentar a maior taxa de crescimento anual com Compound Annual Growth Rate (CAGR), de 8,0 %. Além da crescente demanda no setor de alimentos, bebidas e produtos para cuidados pessoais, os emulsificantes estão encontrando mercado também na forma de micro-emulsão no setor farmacêutico e na biorremediação. O mercado de emulsificantes é um exemplo claro de um mercado estável, com crescimento revivido através da implementação de inovações estratégicas e novas tecnologias (FOOD INGREDIENT BRASIL, 2013).

Os emulsificantes podem ser classificados pela carga, sendo os emulsificantes iônicos responsáveis por estabilizarem emulsões do tipo óleo/água (Figura 6 A). Na interface, o grupo alquila interage com as gotículas de óleo, enquanto os grupos finais carregados se projetam para a fase aquosa. O envolvimento de íons contrários forma uma camada dupla, que previne a agregação das gotículas do óleo. Os emulsificantes não iônicos são orientados na superfície das gotículas do óleo com a proporção polar projetada para a fase aquosa (Figura 6 B) (TADROS, 2013).

Figura 6. Atividade do emulsificante iônico O/A (A) e atividade do emulsificante não-iônico A/O (B).



Fonte: INGREDIENTS BRASIL, 2013

Segundo Tadros et al., (2013) a estrutura das emulsões também é uma forma de classificar o sistema:

1. O/A (óleo/água) e A/O (água/óleo) /macro-emulsões: normalmente possuem uma faixa de tamanho de 0,1 - 5 μ m com uma média de 1-2 μ m.
2. Nano-emulsões: geralmente apresentam muitos tamanhos de 20-100 nm. Igualmente as macro-emulsões, eles são apenas cineticamente estáveis.

3. Emulsões ou micro-emulsões micelares: estes geralmente possuem uma faixa de tamanho de 5-50 nm. Eles são termodinamicamente estáveis.
4. Duplas e múltiplas emulsões: são emulsões-de-emulsões, A/O/A.
5. Emulsões mistas: sistema constituído por duas gotas de dispersantes diferentes que não se misturam de uma forma continua.

Por serem instáveis termodinamicamente as emulsões não se formam espontaneamente, sendo assim necessário fornecer energia para formá-las através de processos físico-químicos como: agitação e a utilização de substâncias homogenizadoras. A propriedade mais importante de uma emulsão é a sua estabilidade, sendo esta dependente de vários fatores como: diferença de densidade entre as fases, viscosidade do sistema, dimensões do dispersóide, relação entre os volumes das fases, existência e valor das cargas elétricas, presença de substâncias tensoativas e da tensão superficial (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; JANEK et al., 2012; UZOIGWE et al., 2015; SOUZA, 2016).

1.3.5 Estabilidade das emulsões

A estabilidade de emulsões de substâncias não miscíveis entre si permite a obtenção de produtos estáveis cuja homogeneização possibilitará o processo industrial. Quando ocorre a adição de um emulsificante a uma emulsão contendo água e óleo é formado na interface dos dois componentes um filme pelas moléculas do emulsificante orientadas de acordo com a sua polaridade. Esta nova condição irá reduzir a tensão interfacial entre os líquidos. Desta forma os líquidos imiscíveis poderão ser dispersos um no outro, através da agitação e formação de micelas. Segundo Wong (1995) a estabilidade coloidal da emulsão considera que as partículas dispersas estão submetidas a ação de duas forças independentes, sendo estas:

1- Atração de Van der Waals: esta força atrativa se origina nas flutuações da densidade eletrônica em um átomo neutro. A distribuição desigual da densidade eletrônica momentaneamente um dipolo que pode induzir a formação de uma estrutura similar em um átomo vizinho

O potencial atrativo entre as partículas é igual a soma de todas as forças sobre todos os átomos, aumenta com o tamanho das partículas e diminui com a distância entre elas.

2- Repulsão eletrostática: uma partícula com uma superfície carregada uniformemente pode causar uma distribuição desigual dos íons da solução, formando uma dupla camada elétrica sobre sua superfície. Os íons com carga oposta a da partícula se acumulam em torno da superfície, em uma concentração que decresce com a distância. Os mecanismos que favorecem

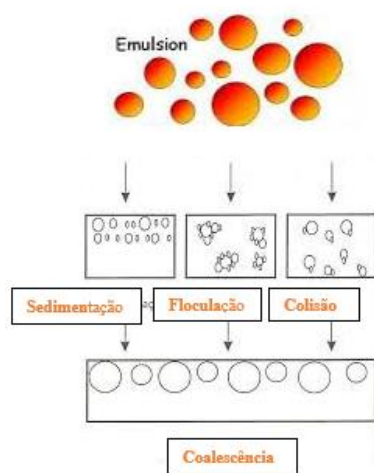
o processo de instabilidade das emulsões são de acordo com Ordóñez (2005), como demonstra a Figura 7:

a) Separação das fases por sedimentação: As gotas dispersas têm densidade diferente da fase dispersante, e, por isso, pode haver sedimentação separação das fases devido à força da gravidade. A velocidade com que se produz a emulsão é diretamente proporcional ao tamanho das gotas da fase dispersa e inversamente proporcional à viscosidade da fase contínua ou dispersante

b) Floculação das gotas devido a supressão das cargas elétricas, com a consequente inibição das repulsões eletrostáticas: As gotas se unem umas as outras, ficando separadas por uma camada finíssima da fase contínua. Mediante a floculação, aumenta-se o tamanho aparente das gotas e, portanto, a velocidade de sedimentação. Os glóbulos movem-se como um conjunto, em vez de individualmente. A floculação não implica na ruptura da película interfacial que envolve o glóbulo e, portanto, não se deve esperar mudança no tamanho dos glóbulos originais.

c) Coalescência das gotas: Aumenta-se se tamanho real, podendo-se chegar a separação das duas fases em duas camadas por uma interface de superfície mínima. Implica, portanto, ruptura da película interfacial.

Figura 7. Esquema dos possíveis mecanismos desestabilização da emulsão



Fonte: Ordóñez, 2005.

Com o objetivo de diminuir o risco da desestabilização rápida das emulsões, é frequente a utilização de emulsificantes que possibilitam propiciar de forma significativa a útil das emulsões. Podemos citar como exemplos: a) Eletrólitos minerais, que proporcionam cargas eletrostáticas às gotas dispersas para elevar a repulsão. b) Moléculas tensoativas, como proteínas, que se

orientam de tal forma que seus extremos hidrofóbicos e hidrofílicos se colocam nas superfícies da interface óleo/água, respectivamente. O acúmulo dessas moléculas na interface reduz tensão superficial. c) Macromoléculas dissolvidas na fase contínua aumentando a viscosidade dessa fase (polissacarídeos espessantes) ou se adsorvendo na interface (proteínas solúveis em água), formando uma barreira na fase da coalescência (ORDÓNEZ, 2005).

1.3.6 Bioemulsificantes

Os termos biossurfactantes e bioemulsificantes são referidos como biomoléculas tensoativas, porém os trabalhos recentes conseguiram identificar diferenças nas características físico-químicas dessas moléculas, passando assim a serem reconhecidas como compostos diferentes, os biossurfactantes são representados por compostos de baixo peso molecular, sendo classificados por lipopeptídeos, glicolípídeos e entre outros (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; SMYTH et al. 2010; FRANZETTI et al. 2012; PEREZ et al., 2017; SILVA, et al., 2017).

Os bioemulsificantes são capazes de estabilizar as emulsões, são moléculas de elevado peso molecular, como exopolissacarídeos, podendo ser misturas complexas de heteropolissacarídeos e lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas. Apresentam uma redução da tensão superficial menos pronunciada quando comparado ao biossurfactante logo métodos como a medição de superfície e tensão interfacial, colapso de gota e testes de hemólise muitas vezes não são suficientes para a identificação e diferenciação entre o bioemulsificante do biossurfactantes, ocasionando assim o descarte de bioemulsificante por não apresentarem alterações significativas da tensão superficial, em relação ao biossurfactante (CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; JAGTAP et al., 2010)

Desta forma, os métodos de índice e atividade de emulsificação são os mais indicados para avaliar capacidade de emulsificação de biomoléculas empregando substratos hidrofóbicos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; UZOIGWE et al. 2015). No bioemulsificante o processo de solubilização de substratos é elevado devido ao seu acesso e disponibilidade para a biodegradação, possibilitando à formação de emulsões estáveis, sendo considerada uma propriedade de grande interesse industrial (SEKHON-RANDHAWA, 2014).

A demanda industrial de emulsificantes vem sendo crescente no mercado de cosmético, alimento, farmacêutica e de petróleo, para atender a essas solicitações os emulsificantes

sintéticos são usados gerando danos ao meio ambiente através da descarga resíduos aquosos ou pela aplicação direta, causando toxicidade a microflora, peixes e bactérias em concentrações de 1mg/L (SMYTH et al. 2010; NITSCHKE, 2016).

Assim, a produção do bioemulsificante gerou o interesse industrial por apresentar características semelhantes aos sintéticos, no entanto com superioridade em relação à baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade e um número elevado de estruturas funcionalidade sob condições extremas de pH, salinidade e temperatura, estabilidade, entre outros (CHANDANKERE et al., 2013, SEKHNON-RANDHAWA,2014), conforme Tabela 1.

A utilização de hidrocarbonetos para a produção do bioemulsificante eleva o custo de produção por serem compostos não miscíveis com água, havendo a necessidade da utilização de equipamentos especiais e gerando um baixo rendimento. O primeiro bioemulsificante produzido comercialmente a partir de hidrocarbonetos foi o "Emulsan" pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012). O "emulsan" é um heteropolissacarídeo polionico com peso molecular de $9,8 \times 10^5$ D, os polissacarídeos que o constituem são três amino-açúcares: D-galactosamina, ácido-galactosamina urônico e um não identificado (SOEMO, 2013; GUDINA et al., 2015).

Outro bioemulsificante com alto peso molecular é o "alasan", um complexo aniônico, composto por um polissacarídeo e uma proteína, isolado da bactéria *Acinetobacter radioresistens* (NAVON-VENEZIA et al., 1995). O gênero *Streptomyces* sp. produziu um bioemulsificante composto de: proteína (82%), a açúcar (1%) e polissacarídeo (17%), que apresenta alta atividade emulsificante e atividade superficial (KOKARE et al., 2007), conforme a Tabela 2.

Tabela 1. Classificação, exemplo e produção mundial dos surfactantes/bioemulsificante

Classificação	Exemplos	Produção Mundial (%)
Aniônicos	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	~50
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTBA)	~5-6
Não-iônicos	Polissorbato (Tween)	~40
Anfóteros	Betaínas (aminoácidos de cadeia longa)	~1

Fonte: SOEMO, 2013

Tabela 2. Principais tipos de bioemulsificantes e micro-organismos produtores

Grupo	Subgrupo	Classe	Micro-organismo
Biossurfactantes Baixo peso molecular	Glicolipídeos	Rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
		Sophorolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp</i>
		Trehalolipídeo	
		Cellobiolipídeos	<i>Ustilago zea</i> , <i>U. maydis</i>
	Lipopeptídios e lipoproteínas	Surfactina	<i>Bacillus subtilis P. fluorescens B. licheniformis</i>
		Viscosina	
		Peptídio	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Ácido-graxo, lipídio neutro e fosfolipídeos	Ácidos graxos	
		Lipídios neutros	<i>C. lepus</i>
	Bioemulsificante Alto peso molecular	Surfactantes poliméricos	Fosfolipídeos
Emulsan			<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan			<i>A. calcoaceticus</i>
Alasan			<i>A. radioresistens</i>
Surfactantes Particulados		Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
		Vesículas e fímbrias Células inteiras	<i>A. calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: BENTO, CAMARGO, GAYLARDE (2008); SOURAV et al. (2015); UZOIGWE et al. (2015).

1.3.7 Micro-organismos produtores de bioemulsificantes

Muitos micro-organismos tem a capacidade de produzir compostos anfifílicos, como biossurfactantes e bioemulsificantes, que exibem atividades de superfície e interfacial, formação de micelas e macro e micro-emulsões entre líquidos de fases imiscíveis (CHEN et al., 2010; PENFOLD et al., 2011; FRANZETTI et al., 2012). Satpute et al., (2008) e Satpute et al., (2010), investigaram micro-organismos marinhos que apresentavam a capacidade de produzir biossurfactante e bioemulsificante, dentre esses micro-organismos foram identificados vários gêneros de bactérias: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, e leveduras, entre os 56 isolados, 35 produziram bioemulsificante e apenas 16 produziram biossurfactantes. Um bioemulsificante mais comercializado e disponível no mercado, é o emulsan, patenteado por Gutnick et al. (1980), um lipopolissacarídeo extracelular associado a proteína produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ATCC 31012, com alto peso molecular (em torno de 1000 kDa), não reduz a tensão interfacial, protege as gotas de óleo da coalescência e um forte estabilizante de emulsão (ROSENBERG et al., 1979; CHAMAKH et al., 2008; SUTHAR et al., 2008).

Há outros bioemulsificantes com alto peso molecular, como o alasan, um complexo aniônico, composto por um polissacarídeo e uma proteína, isolado da bactéria *Acinetobacter radioresistens* (NAVON-VENEZIA et al., 1995). O gênero *Streptomyces sp.* produz um

bioemulsificante composto de proteína (82%), açúcar (1%) e polissacarídeo (17%), que apresenta alta atividade emulsificante e atividade superficial (KOKARE et al., 2007). Fungos unicelulares também são conhecidos como produtores de bioemulsificantes, como o liposan, produzido pela levedura *Candida lipolytica* e mannan produzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BANAT et al., 2010). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis*, por exemplo, tem sido utilizado em molhos prontos para salada (SHEPHORD et al., 1995; NITSCHKE & PASTORE, 2010).

Na literatura, a maior parte dos trabalhos relatam a produção de biossurfactante/bioemulsificante por bactérias, principalmente dos gêneros *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Arthobacter sp.* (PIRÔLLO, 2006; BUENO, 2008; BUGAY, 2009; VATSA et al., 2010; CHEBBI et al., 2017). Porém, a aplicação da maioria dos bioemulsificantes/biossurfactantes de origem bacteriana possui limitações, pois não é adequada para utilização na indústria alimentícia e farmacêutica, devido a sua possível natureza patogênica (SHEPHERD et al., 1995; FONTES et al., 2008; ELSHIKH et al., 2017).

Sendo assim, começaram a aparecer maiores relatos na literatura da produção de bioemulsificante/biossurfactante (Tabela 3) por algumas leveduras, principalmente dos gêneros *Candida*, *Torulopsis* e *Rhodotorula* (VAN-HAMME et al., 2006; GARAY et al., 2017), e fungos filamentosos como *Aspergillus sp.* e *Phialemonium sp.* (MARTINS et al., 2008; CASTIGLIONI et al., 2009).

Tabela 3. Fungos produtores de bioemulsificantes.

Micro-organismos	Bioemulsificante	Referências
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Bioemulsificante	Maia et al., 2018
<i>Penicillium 8CC2</i>	Bioemulsificante	Sena et al., 2014
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Derivado de policeteto	Gao et al., 2010
<i>Ustilago maydis</i>	Lípidos Celobiose	Teichmann et al., 2007
<i>Candida tropicalis</i>	Ácido graxo Manano	Miura, 2017
<i>Candida lipolytica Y-917</i>	Soforolipídio	Shekhar et al., 2015
<i>Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682</i>	Yansan	Coelho et al., 2010

Fonte: Alizadeh-Sani et al., 2018.

1.3.8 Importância e função fisiológica dos bioemulsificantes para os micro-organismos

Em estudo recente proposto por Butt et al., (2016), mostrou que uma das principais funções dos emulsificantes de origem microbiana está relacionada a aderência das células em diferentes interfaces. Esta adesão é um mecanismo fisiológico necessário para o crescimento e emergência das células em ambientes. Um caso especial de adesão é o crescimento de micro-organismo em hidrocarbonetos insolúveis em água, a adesão microbiana às superfícies abióticas é atribuída a interações entre as moléculas e o meio no qual estão inseridos.

Quando os bioemulsificantes sintetizados são excretados na água, essas moléculas tensoativas causam uma deformação da estrutura tetraédrica da água vigor existentes das ligações de hidrogênio entre as moléculas da água, levando numa as diferenças nas interações entre as marcas do meio. Uma vez que as enzimas necessárias para uma degradação do hidrocarboneto, alimentação deve entrar em contato com o substrato. O crescimento dos direitos em certas superfícies é influenciado pelo biossurfactante, o qual forma uma película sobre uma interface, estimulando certos micro-organismos anexarem-se a essas interfaces, enquanto inibem a ligação de outros (HUA et al., 2003). Além disso, os bioemulsificantes podem ser utilizados para regular as propriedades de celular, a fim de agregar ou desagregar as superfícies de acordo com a sua responsabilidade (ROSENBERG e RON, 1999). Minerais micro-organismos agentes emulsificantes extracelulares para auxiliares uma degradação de hidrocarbonetos, contando uma importante função no crescimento estes organismos em substratos imiscíveis a água. Há algum tempo entre uma produção de emulsificante e crescimento em hidrocarbonetos. Organismos que produziam emulsificantes foram capazes de crescer em substratos insolúveis em água, em contrapartida, os mutantes, que não é emulsificante, tem uma inibição de crescimento em ambientes contendo hidrocarbonetos. Para o crescimento de micro-ambientes, uma área de superfície interfacial entre a água e a alimentação pode ser um fator limitativo emulsão é um processo natural provocado por agentes extracelulares é indireta. Devido a isso é importante para a compreensão de como o processo da emulsificação pode ser uma vantagem evolutiva para o micro-organismo que produz o emulsionante (BARKAY et al., 1999; KHAN; BUTT, 2016).

Um dos principais motivos para uma persistência prolongada de hidrofóbicos com peso molecular é a baixa solubilidade em água, o que aumenta a sua sorção em superfícies e limita sua disponibilidade de biodegradação por micro-organismos. Os bioemulsificantes podem facilitar o crescimento de um processo atuando no processo de dessorção destes compostos hidrofóbicos contido em superfícies, ou aumentando a sua solubilidade em água. Ultimamente, foi avaliado que Alasan (um bioemulsificante polimérico) aumenta a solubilidade de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) de 5 a 20 vezes e, portanto, aumenta significativa

a sua velocidade de biodegradação (ROSENBERG e RON, 1999; JORDAN et al., 1999). Além das principais funções dos bioemulsificantes (aumento da disponibilidade de substratos hidrofóbicos e fixos nas superfícies) essas biomoléculas podem ser separadas como uma estratégia de defesa evolutiva dos micro-organismos. Um exemplo pode ser evidenciado pela atividade antifúngica do biosurfactante produzido pelo fungo *Clavulina humicola*. Analogias Similares Podem Ser Feitas Para o Biosurfactante Lipopeptídico Sintetizado por *Bacillus subtilis*, o lipopeptídico com ação antibiótica teria forte influência sobre a sobrevivência de *B. subtilis* em seu habitat natural, solo e rizosfera (COOPER, 1986; PUCHKOV et al., 2002)

1.3.9 Fatores que influenciam na produção de bioemulsificante

Os parâmetros do meio de cultivo irão favorecer ou reprimir a síntese do bioemulsificante. O efeito sobre a produção está relacionado à fonte de carbono, nitrogênio, sais, concentração de NaCl, pH, temperatura, agitação, aeração e o próprio micro-organismo produtor (SYAHRIANSYAH et al., 2016).

A fonte de carbono é considerada um dos fatores que mais influenciam na síntese uma vez que pode promover o crescimento do micro-organismo. A produção de origem microbiana exige uma combinação de fontes de carbono hidrofílica (glicose, lactose, alcanos) e hidrofóbica (óleo de soja, óleo de milho, óleo de linhaça, azeite de oliva e seus efluentes obtidos da produção industrial) (SAJNA et al, 2013; RUFINO et al., 2014)

Makkar, Cameotra (2002) observaram a produção por *Bacillus subtilis* onde a glicose, a sacarose e o piruvato de sódio foram favoráveis na produção do bioproduto, enquanto o n-hexadecano favoreceu apenas o crescimento da cultura durante a fermentação.

Aparma et al. (2012) analisaram diferentes substratos de baixo custo, tais como melaço, glicerol, soro de leite e meio de fermentação composto sem fonte de carbono, rendimento da produção de raminolipídeos (0.22 g/L) foi inferior se comparada às demais fontes.

Utilizando fontes de carbono hidrofóbico, Bhangale et al. (2014) relacionaram diferentes ácidos graxos oriundos do óleo de mamona e glicerol com a estrutura do soforolipídeo produzido.

As fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio são consideradas o segundo fator que mais influencia na produção de surfactantes biológicos. O extrato de levedura combinado aos sais de KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ são as fontes mais utilizadas, pois as variações das suas concentrações influenciam diretamente na relação C/N (TILAY ANNAPURE, 2012).

Essa razão é avaliada em muitos estudos, pois está diretamente relacionada ao metabolismo microbiano, geralmente a produção 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 % (NaNO_3) e 25 % de extrato de levedura produziu um pequeno aumento na produção de biotensoativo por *Aspergillus ustus*, sendo, portanto necessária 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. A temperatura pode favorecer o decréscimo ou aumento da síntese, pois o aumento da biomassa favorece a liberação dos produtos metabólicos da célula microbiana (SAHOO et al., 2011).

O pH do meio influencia o crescimento celular e a síntese de metabólitos secundários. O rendimento da produção de lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* foi estável sobre condições alcalinas e neutras (ZHAO et al, 2013). Khopade et al. (2012) otimizaram a produção do biossurfactante por *Nocardiosis sp.* em pH 7,0 a temperatura de 30°C, reduzindo a tensão superficial para 30 mN/m. A produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu o aumento do rendimento entre a faixa de pH 7,0-7,15 (AL-ARAJI et al, 2007) e a temperatura ótima foi de 37°C (JAYACHANDRAN, 2013).

A agitação e a aeração possuem efeitos combinados, pois ambos facilitam a transferência de oxigênio no meio de fermentação (AQUARONE, 2001). Estes fatores também auxiliam a produção de bioemulsificantes, pois possibilitam a solubilização de substratos insolúveis em água e conseqüentemente o transporte de nutrientes no meio de fermentação para o microrganismo (RAMKRISHNA et al.,2010). Willenbacher et al. (2015) observaram um acréscimo do rendimento durante a produção de surfactina aplicando o processo fermentativo anaeróbico para controlar formação de espuma.

1.3.10 Classificação dos biossurfactante/bioemulsificantes

Os bioemulsificantes podem ser classificados de acordo com algumas de suas características como, por exemplo, seu peso molecular, carga iônica e tipo de secreção. Contudo, o princípio fundamental de classificação continua a ser sua estrutura química, o que eles permitem serem divididos nas seguintes classes: glicolipídicos, lipopeptídicos, surfactantes ácidos graxos, fosfolipídios, lipídios neutros e biossurfactantes poliméricos (LUKIC et al., 2016).

Ao contrário dos surfactantes sintetizados quimicamente, onde são classificados pela natureza do seu grupo polar, bioemulsificantes são classificados por sua composição e também pela origem microbiana (FATHABAD, 2010).

Alguns dos surfactantes biológicos e seus respectivos micro-organismos produtores são representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Biossurfactantes produzidos por micro-organismo:

Glicolípídeo	Micro-organismo
Ramnolípídeo	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Trealolípídeo	<i>Nocardia eritrofia</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Torulopsis cândida</i>
Soforolípídeo	<i>T. bombicola</i> <i>T. petrophilium</i>
Lipopeptídeo e Lipoproteína	
Peptídeo-lípídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettina	<i>Serratia marcescens</i>
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
Surfactina	<i>B. subtilis</i>
Gramicidinas	<i>B. brevis</i>
Polimixinas	<i>B. polymyxa</i>
Ácidos Graxos, Lipídeos Neutros e Fosfolípídeos	
Ácidos Graxos	<i>Candida lepus</i>
Lipídeos Neutros	<i>Nocardia eritrofia</i>
Fosfolípídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersa	<i>A. calcoaceticus</i>
Manana-lípídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>

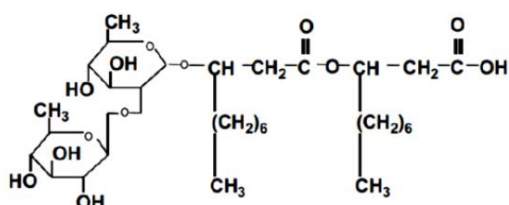
Fonte: Nitschke et al., (2002)

a) Glicolipídeos

É uma classe mais conhecida dos biossurfactantes (Mercade & Manresa, 1994). São carboidratos combinados com cadeias longas de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos. Entre os glicolipídeos, os mais conhecidos são os raminolipídeos, trealolipídeos, soforolipídeos e manosileritritol lipídeos (SANTOS et al., 2016).

- Raminolipídeo - Os raminolipídeos são os glicolipídeos mais estudados. São formados por uma ou duas moléculas de raminose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico. A produção de glicolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* contendo ramnose foi primeiro descrito por Javis & Johnson em 1949 (citado por Desai & Banat, 1997). Os principais glicolipídeos sintetizados por *P. aeruginosa* são os ramnolipídeos dos tipos 1 e 2, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Figura 8), respectivamente. UMA formação de ramnolipídeos do tipo 3, contendo uma molécula de ácido β -hidroxidecanoico; do tipo 4, com uma ou duas unidades de ramnose; metil-ésteres derivados dos raminolipídeos 1 e 2 e, ramnolipídeos com outras cadeias de ácidos graxos também já foram previamente citadas (Kronemberger et al., 2007; Desai & Banat, 1997). Os raminolipídeos mostram filhotes com a comparação de outros biossurfactantes em diversas fontes de materiais renováveis, como por exemplo, óleos e resíduos agroindustriais (Sánchez et al., 2007), além de resíduos de toxicidade dez vezes menor quando comparados a surfactantes sintéticos (SANTA ANNA et al., 2002).

Figura 8 - Estrutura do biossurfactante/bioemulsificante L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato

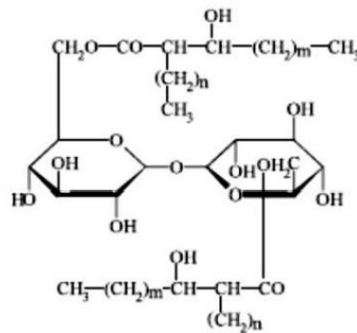


Fonte: Mulligan (2005).

- Trealolipídeo - Desai (1987) definiu trealolipídeos como compostos formados pela ligação do dissacarídeo trealose ligado a duas moléculas de ácido hidroxicarboxílico de cadeia longa e ramificada. Trealolipídeos são produzidos por uma série de micro-organismos diferentes, tais como *Mycobacterium*, *Nocardiae Corynebacterium* and its composition is influenciada por

condições de cultivo (Banat et al., 2010). No entanto, mais extensivamente composto estudado na classe são dimicolatos trealose (Figura 9) produzido por *Rhodococcus erythropolis*.

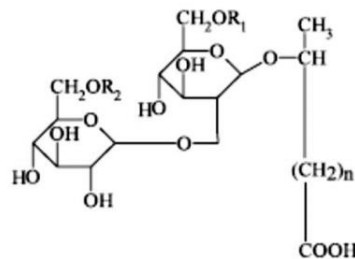
Figura 9 - Estrutura do bioemulsificante/bioemulsificante dimicolato trealose



Fonte: Banat et al. (2010)

• Soforolípídeos - são formados por molécula de sofrorose ligada a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado (Figura 10). Esses bioemulsificante/bioemulsificantes são sintetizados principalmente por leveduras tais como *Candida bombicola*, também conhecida como *Torulopsis bombicola*, *Centrolene petrophilum*, *Candida apicola* e *Rhodotorula bogoriensis*, *Pseudozyma*, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma antártica* e *Pseudozyma rugulosa* (KURTZMAN et al., 2010; INES; DHOUHA, 2015). Estudos realizados por Shin e colaboradores (2010), utilizando o óleo de cozinha Como fonte de carbono e levedura *Candidade bombicola* ATCC 22214 como micro-organismo, obtiveram em seus resultados um vaso de biodegradabilidade e uma alta produtividade.

Figura 10 - Estrutura do bioemulsificante/bioemulsificante sofrorolípídeo ácido.



Fonte: Banat et al. (2010).

b) Lipoproteínas ou lipopeptídeos

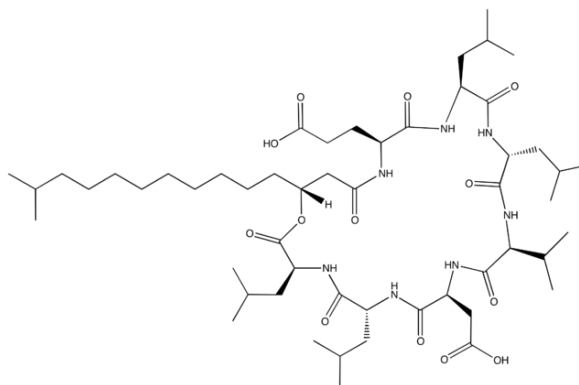
Micro-organismos diversos, tais como, fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* ou bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são capazes de sintetizar lipopeptídicos. Essas moléculas caracterizam-se por um pequeno oligopeptídico, linear ou circular, acoplado a um ácido graxo β -hidroxilo (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014).

Biossurfactantes/bioemulsificantes lipopeptídicos possuem uma ampla diversidade estrutural, o que imposto para as variáveis de inundação. Essas biomoléculas podem ser utilizadas como emulsionantes, dispersantes, formadores de espuma, redutores de viscosidade, agentes solubilizantes e mobilizadores. (MNIF e GHRIBI, 2015; LUKIC et al., 2016).

Lipoproteínas são peptídeos cíclicos de ocorrência natural que contém uma única cadeia de ácidos graxos, sendo uma classe de biossurfactante mais descrita por sua atividade antimicrobiana (KANMANI et al., 2013). O lipopeptídeo mais conhecido é Surfactina denominada (Figura 11), produzido por *Bacillus* sp., um dos biossurfactantes mais potente, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com uma concentração menor que 0,005% (RAHMAN; GAKPE, 2008).

Uma aplicação de bioemulsificantes lipopeptídicos têm sido estudados cosméticos como, por exemplo, produtos de limpeza facial, antienvhecimento, cosméticos para clareamento como agentes de branqueamento e, por último, como um potente antimicrobiana, garantindo a preservação do produto (MUKHERJEE, 2007; MANDAL; BARBOSA; FRANCO, 2013).

Figura 11- Estrutura da surfactina.



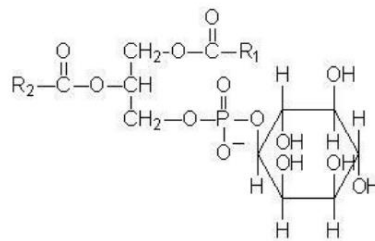
Fonte: Lang (2002).

c) Ácidos graxos, fosfolipídicos e espécies neutros

Diversas bactérias e leveduras para grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídeos como tipo de biossurfactante em seu crescimento em substrato contendo n- alcanos. Os ácidos graxos

são produzidos a partir de alcanos, como resultado de oxidações microbianas. Além dos ácidos graxos de cadeia linear, os micro-organismos grupo de e-mails com base OH e ramos alquil (RAHMAN; GAKPE, 2008; SHAH et al., 2016). De acordo com Desai e Banat (1997), uma produção de fosfolipídeos também são as calorias de cultivo, bem como a fonte de carbono substrato e assim, diferentes tipos podem ser sintetizados. Os principais tipos de fosfolipídeos são: fosfatidiliossol (Figura 12), fosfatidiglicerol e ácido fosfatídico.

Figura 12 - Estrutura do bioemulsificante fosfatidiliositol.

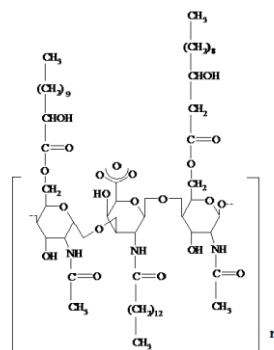


(Fonte: <http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/lipid-synthesis-sp.html>, acessado em 17/10/2018)

d) Surfactantes/emulsificantes poliméricos

Emulsan, lipomanan, alasan, liposan e outros complexos de proteínas e polissacáridos são os bioemulsificantes poliméricos mais relatados. Essa classe de bioemulsificante/bioemulsificantes apresenta alta afinidade por interfaces óleo/água, facilitando uma formação de emulsões estáveis, fazendo com que mesmo em baixas padrão são ricos em aumentos de emulsificações (Borges, 2011). O Emulsan (Figura 13) é um emulsificante de com base em 0,001% a 0,01% (LANG, 2002; HATHA; EDWARD; RAHMAN, 2007). Liposan é um emulsificante solúvel em água extracelular sintetizado por *Candida lipolytica* sendo constituído por 83% de carboidratos e 17% de proteínas (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984; SANTOS et al., 2016).

Figura 13 - Estrutura do bioemulsificante Emulsan.



Fonte: Desai e Banat (1997).

e) Surfactantes particulados

Surfactantes particulados geralmente são sintetizados pela bactéria *Acinetobacter sp.* Com base em um mecanismo de partição da membrana dando origem a vesículas extracelulares, como quais formam microemulsões. Esse composto formado um papel fundamental na absorção do hidrocarboneto alcano pela célula microbiana (DESAI; BANAT, 1997; SHAH et al., 2016).

1.3.11 Produção de bioemulsificante

Apesar das várias propriedades atrativas e das numerosas vantagens comparadas aos surfactantes/emulsificantes químicos, como maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior compatibilidade com o meio ambiente, e estabilidade mesmo sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015), a produção de bioemulsificante em escala industrial não tem sido realizada devido aos elevados custos de investimento (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN; GAKPE, 2008), não sendo capaz de competir economicamente com os sintéticos (JOSHI; DESAI, 2010). Em 2015, tanto Hausmann e Sydatk, quanto Chen, Juang e Wei, reafirmaram que o alto custo de produção dos bioemulsificantes tem impedido o seu desenvolvimento em nível industrial, em 2010, Joshi e Desai revelaram que sua produção é pelo menos 50 vezes mais cara, dependendo do tipo de biosurfactante e de sua pureza.

Saharan, Sahu e Sharma (2011) relataram que existe uma estratégia básica para reduzir os altos custos da produção de bioemulsificante que tem sido aplicada em todo o mundo para tornar o processo mais rentável. Esta alternativa consiste na redução do custo inicial com matérias-primas, através do uso de substratos de baixo custo e resíduos como meios fermentativos. Uma outra estratégia seria desenvolver de bioprocessos eficientes e otimizados quanto às condições de cultivo e nos processos de recuperação mais econômicos, maximizando a produção e recuperação do biosurfactante.

1.3.12 Substratos agroindustriais

Diversos resíduos agroindustriais têm sido descritos para produção de biosurfactante/bioemulsificante, como soro de leite (DUBEY; JUWARKAR, 2001; NITSCHKE; PASTORE, 2006), resíduos de batata (THOMPSON et al., 2001; NOAH et al., 2002; NOAH et al., 2005), manipueira (NITSCHKE; PASTORE, 2006; BEZERRA, 2006; AL-BAHRY et al., 2013), óleos de fritura (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; SANTOS et al., 2016), milhocina () que são fontes de carbono renováveis e de baixo custo.

1.3.12.1 Óleos de fritura

Óleos de fritura são produzidos em larga escala tanto nas indústrias como no ambiente doméstico, e podem atuar efetivamente como um substrato de baixo custo para a produção de biossurfactante, uma vez que são excelentes fonte de carbono (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; SANTOS et al., 2016). Os óleos vegetais são constituídos por lipídeos, geralmente compreendendo ácidos graxos saturados e insaturados, com cadeias entre 16 e 18 átomos de carbono (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Na literatura, diversos tipos de óleos de refinarias e da indústria alimentícia têm sido avaliados para a produção de biossurfactante. Conforme Saharan, Sahu e Sharma (2011) relataram o uso de óleos industriais como sebo, banha, óleos marinhos e ácidos graxos livres para este fim.

Lima et al. (2009) demonstraram que *Pseudomonas aeruginosa* PACL foi capaz de produzir bioemulsificante/biossurfactante utilizando resíduos da produção do óleo de soja em fermentação submersa. O uso de resíduos da fabricação do óleo de oliva e de óleos de fritura obtida do girassol, também promoveram a produção de rhamnolipídeos por *P. aeruginosa* 47 T2, e, cerca de 8,1 mg qmL (ZHANG et al., 2009).

1.3.12.2 Milhocina

Agroindustrialização de produtos à base de milho através de processamento úmido resulta em subprodutos sólidos e líquidos, que dispostos de forma inadequada tornam-se fontes de contaminação e agressão ao meio ambiente. A milhocina é um rejeito da água de lavagem e embebução dos grãos de milho quando do fracionamento em amido e germen (óleo), contendo 40% de sólidos. Possui entre 21% a 45% de proteínas, 20% a 26% de ácido lático, cerca de 8% de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ etc), cerca de 3% de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9% - 1,2%) (AKHTAR et al., 1997; CARDINAL et al., 1948; HELMY et al., 2011).

A milhocina é um resíduo de refinaria de petróleo relatado como nutrientes de baixo custo para a produção de um biossurfactante glicolipídico de *Candida sphaerica* (UCD 0995). O bioemulsificante recuperou cerca de 95% de óleo de motor adsorvido em amostra de areia e apresentou vastas aplicações em processos de biorremediação (LUNA et al., 2011; 2013; 2015). Silva et al. (2014b) mostraram também a produção de um novo bioemulsificante de *Pseudomonas cepacia* cultivada em meio mineral suplementado com 2,0% de milhocina e 2,0% de óleo de soja pós fritura.

1.3.12.3 Manipueira

A manipueira é o efluente resultante da industrialização da mandioca, decorrente da prensagem da mandioca ralada e lavada no processo da obtenção da farinha (COSTA et al., 2009). Esse resíduo possui um elevado teor de matéria orgânica e um glicosídeo chamado linamarina que é facilmente hidrolisado a cianeto, composto tóxico ao metabolismo, sendo na maioria das vezes descartada in natura nos cursos d'água acarretando em problema ambiental (COSTA et al., 2009; CORDEIRO, 2006). Alguns estudos utilizando manipueira com substrato têm sido realizados: Nitschke e Pastore (2004) utilizaram a manipueira como fonte de carbono para produção de surfactina por duas linhagens de *Bacillus subtilis*, a qual observaram uma redução da tensão superficial de 49,5 para 26,6 e 25,9 mN/m.

Barros et al., (2008) em seu trabalho sobre a produção de bioemulsificante por *B. subtilis* obtiveram um rendimento de 2,4 g/L de surfactina. Concluindo que em função da sua composição e da produtividade, a manipueira foi identificada como sendo um bom substrato para a produção de bioemulsificante.

1.3.13 Aplicações dos biossurfactantes e bioemulsificantes

1.3.13.1 Biossurfactantes e Bioemulsificantes em Processos de Biodegradação

A aplicação mais significativa de biossurfactantes foi estudada em biorremediação, por exemplo, na remoção de metais pesados (FRAZETTI et al. 2009; ASCI et al. 2010) e hidrocarbonetos dos locais contaminados (KOSARIC et al., 1987). Os biossurfactantes e bioemulsificantes podem melhorar a biorremediação de hidrocarbonetos por dois mecanismos. Em primeiro lugar, aumentando a biodisponibilidade do substrato para micro-organismos, enquanto o outro envolve a interação com a superfície celular, que aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo substratos hidrofóbicos para se associar mais facilmente com as células bacterianas (MULLIGAN E GIBBS, 2004). Ao reduzir as tensões interfaciais, os bioemulsificantes aumentam as áreas superficiais dos compostos insolúveis, levando a uma maior mobilidade e biodisponibilidade dos hidrocarbonetos. A capacidade de bioemulsificantes e cepas bacterianas produtoras de bioemulsificante para aumentar a disponibilidade de contaminantes orgânicos e as taxas de biodegradação foi relatada por muitos autores (RAHMAN et al. 2003; INAKOLLU et al. 2004; SHEKHAR et al., 2014).

Obayori et al. (2009) investigaram as propriedades biodegradativas do biossurfactante produzido por *Pseudomonas sp.* Kang et al. (2010) utilizaram o sofrorolipídio em estudos de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e petróleo iraniano, cru em condições de laboratório. A adição deste biossurfactante ao solo também aumenta a biodegradação dos hidrocarbonetos

testados com a taxa de degradação variando de 85% a 97% da quantidade total de hidrocarbonetos. Seus resultados indicaram que o soforolípido pode ter potencial para facilitar a biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos com limitada solubilidade em água e aumentar a biodisponibilidade de consórcios microbianos para biodegradação. A utilidade de cepas produtoras de bioemulsificante na biorremediação de sítios altamente contaminados com hidrocarbonetos de petróleo bruto foi confirmada por Das e Mukherjee (2007) e Elsheshtawy et al. (2013).

Os biossurfactantes e bioemulsificantes também têm sido eficientes na biorremediação de metais pesados, que tendem a ser fortemente absorvidos na matriz de solos e sedimentos, limitando sua solubilidade e dificultando a sua remoção subsequente (GUTIERREZ et al., 2008; COLIN et al., 2013). Portanto, o método de lavagem com biossurfactantes e aumenta a dessorção de metais em solos e sedimentos, tornando esses poluentes para a captação microbiana, que são degradados em produtos inócuos (ANISZEWSKI et al., 2010; BANAT et al., 2010; AÇIKEL 2011, COLIN et al., 2013).

1.3.13.2 Biossurfactantes na indústria farmacêutica

Kakugawa et al. (2002) e Mukherjee et al. (2006) demonstraram que os bioemulsificantes poderiam ter uma ampla gama de aplicações em campos farmacêuticos, como entrega de genes, agentes para insuficiência respiratória, adjuvantes imunológicos, agentes antiadesivos em cirurgias, inibição da adesão de organismos patogênicos a superfícies sólidas, recuperação de produtos intracelulares, atividade antimicrobiana, atividade antiviral, atividade anticancerígena e agentes para a estimulação do metabolismo de fibroblastos da pele (SHEKHAR et al., 2014).

1.3.13.3 Biossurfactantes e na indústria de pesticidas

Os surfactantes são obrigatórios como adjuvantes com fungicidas, inseticidas e herbicidas. O surfactante sintético atualmente utilizado nas indústrias de pesticidas atua como emulsificante, dispersante, espalhante e agente umectante e aumenta a eficiência dos pesticidas. Além disso, esses surfactantes são usados como inseticidas na agricultura moderna, pois possuem propriedades defensivas (ROSTAS et al. 2009). Diferentes tipos de surfactantes/emulsificantes como aniônico, catiônico, anfótero e não-iônico estão sendo usados atualmente em várias indústrias de manufatura de pesticidas (MULQUEEN, 2003). Há um relatório sobre bactérias pertencentes à *Pseudomonas sp.* e *Burkholderia sp.* do campo de arroz para degradar os surfactantes (NISHIO et al. 2002). Agricultura produtos importantes como pesticidas formados com a ajuda de biossurfactante podem ser amplamente utilizados em campos agrícolas. A necessidade de indústrias agroquímicas é desenvolver uma tecnologia de formulação eficaz e

alcançar esse objetivo; muitas empresas podem empregar mistura de bioemulsificantes em diferentes combinações com os polímeros para fazer excelentes formulações para aplicações agrícolas.

1.3.13.4 Biossurfactantes na indústria de alimentos

Na indústria alimentícia, os bioemulsificantes são de grande interesse, como aditivo alimentício, contribuindo com numerosos papéis funcionais, como: Equilibrar as variações na qualidade das farinhas; Melhorar a consistência dos ingredientes; Preservar o frescor e as características sensoriais; Aumentar a velocidade de transformação; Melhorar a estabilidade das massas; Promover a aeração e o ganho de volume de pães e bolos; Diminuir o consumo de ovos e gorduras; Aumentar o rendimento do processo; Retardar o envelhecimento (aumento da vida de prateleira); Melhorar a textura e cremosidade de produtos lácteos (CASTRO et al., 2012; NETA et al., 2012; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; HEYMAN et al., 2014; CAMPOS et al., 2015).

Estudos relatam formulações alimentares envolvendo nanoemulsões e emulsões por bioemulsificantes (SAMAVATI et al., 2014; ADJONU et al., 2014; CAMPOS et al., 2015).

1.3.14 História do Arduíno

O projeto iniciou-se na cidade de Ivrea, Itália, em 2005, com o intuito de interagir em projetos escolares de forma a ter um orçamento menor que outros sistemas de prototipagem disponíveis naquela época. O sucesso foi sinalizado com a obtenção de uma menção honrosa na categoria Comunidades Digitais em 2006, pela Prix Ars Electronica, além da marca de mais de 50.000 placas vendidas até outubro de 2008. Atualmente, o seu hardware é feito através de um microcontrolador Atmel AVR, sendo que este não é um requisito formal e pode ser estendido se tanto ele quanto a ferramenta alternativa suportarem a linguagem arduino e forem aceites pelo seu projeto. Considerando esta característica, muitos projetos paralelos inspiram-se em cópias modificadas com placas de expansões, e acabam recebendo os seus próprios nomes (THOMPSON et al., 2008)..

Arduíno é uma plataforma de prototipagem eletrônica de hardware livre e de placa única, projetada com um microcontrolador Atmel AVR com suporte de entrada/saída embutido, uma linguagem de programação padrão, a qual tem origem em Wiring, e é essencialmente C/C++. O objetivo do projeto é criar ferramentas que são acessíveis, com baixo custo, flexíveis e fáceis de se usar por principiantes e profissionais. Principalmente para aqueles que não teriam alcance aos controladores mais sofisticados e ferramentas mais complicadas (LINS et al., 2017).

Pode ser usado para o desenvolvimento de objetos interativos independentes, ou ainda para ser conectado a um computador hospedeiro. Uma típica placa Arduino é composta por um controlador, algumas linhas de E/S digital e analógica, além de uma interface serial ou USB, para interligar-se ao hospedeiro, que é usado para programá-la e interagi-la em tempo real. A placa em si não possui qualquer recurso de rede, porém é comum combinar um ou mais Arduinos deste modo, usando extensões apropriadas chamadas de shields. A interface do hospedeiro é simples, podendo ser escrita em várias linguagens. A mais popular é a Processing, mas outras que podem comunicar-se com a conexão serial são: Max/MSP, Pure Data, SuperCollider, ActionScript e Java. Em 2010 foi realizado um documentário sobre a plataforma chamado Arduino: The Documentary (VIANNA e LIMA, 2014).

1.3.15 Estrutura do Arduíno

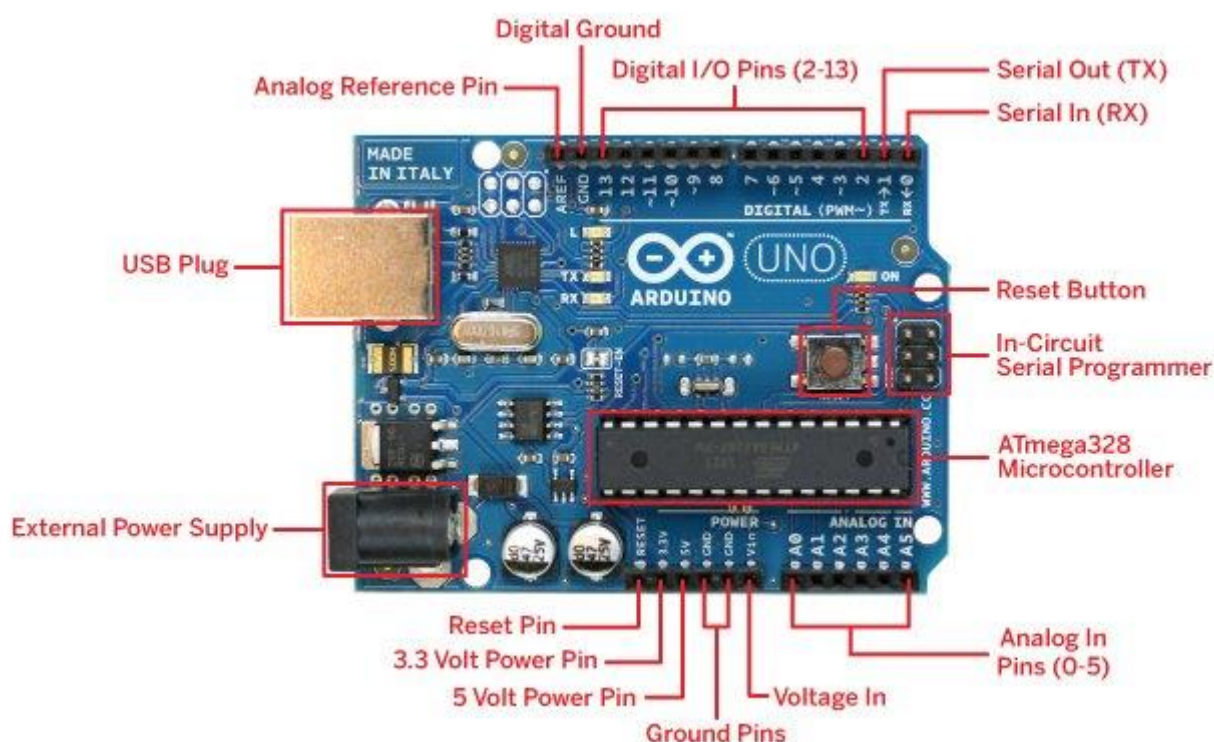
1.3.15.1 Hardware

A sua placa consiste num microcontrolador Atmel AVR de 8 bits, com componentes complementares para facilitar a programação e incorporação noutros circuitos. Um importante aspecto é a maneira padrão como os conectores são expostos, permitindo o CPU ser interligado a outros módulos expansivos, conhecidos como shields. Os Arduinos originais utilizam a série de chips megaAVR, especialmente os ATmega8, ATmega168, ATmega328 e a ATmega1280; porém muitos outros processadores foram utilizados por clones deles. A grande maioria de placas inclui um regulador linear de 5 volts e um oscilador de cristal de 16 MHz (podendo haver variantes com um ressonador cerâmico), embora alguns esquemas como o LilyPad usem até 8 MHz e dispensem um regulador de tensão embutido, por terem uma forma específica de restrições de fator. Além de ser microcontrolador, o componente também é pré-programado com um bootloader, o que simplifica o carregamento de programas para o chip de memória flash embutido, em comparação com outros aparelhos que geralmente demandam um chip programador externo (ARDUINO, 2015).

Conceitualmente, quando o seu software é utilizado, ele monta todas as placas sobre uma programação de conexão serial RS-232, mas a forma de implementação no hardware varia em cada versão. As suas placas de serie contêm um simples circuito inversor para converter entre os sinais dos níveis RS-232 e TTL. Atualmente, existem alguns métodos diferentes para realizar a transmissão dos dados, como por placas programáveis via USB, adicionadas através de um chip adaptador USB-para-Serial, como o FTDI FT232. Algumas variantes, como o Arduino Mini e o não oficial Boarduino, usam um módulo, cabo adaptador USB, bluetooth ou outros métodos. Nestes casos, são usados com ferramentas microcontroladoras ao invés do Arduino IDE,

utilizando assim a programação padrão AVR ISP. A maioria dos pinos de E/S dos microcontroladores (Figura 14) são para uso de outros circuitos. A versão Diecimila, que substituiu a Duemilanove, por exemplo, disponibiliza 14 pinos digitais, 6 das quais podem produzir sinais MLP, além de 6 entradas analógicas. Estes estão disponíveis em cima da placa, através de conectores fêmeas de 0,1 polegadas (ou 0,25 centímetros) (MONK, 2015).

Figura 14. Componentes da plataforma arduino.



(html Fonte: <http://bodgarage.repofy.com/?p=959>, acessado em 16/12/2018)

1.3.15.2 Software

O Arduino IDE é uma aplicação multiplataforma escrita em Java derivada dos projetos Processing e Wiring. É esquematizado para introduzir a programação para artistas e para pessoas não familiarizadas com o desenvolvimento de software. Inclui um editor de código com recursos de realce de sintaxe, parênteses correspondentes e indentação automática, sendo capaz de compilar e carregar programas para a placa com um único clique. Com isso não há a necessidade de editar Makefiles ou rodar programas em ambientes de linha de comando. Tendo uma biblioteca chamada "Wiring", ele possui a capacidade de programar em C/C++. Isto permite criar com facilidade muitas operações de entrada e saída, tendo que definir apenas duas funções

no pedido para fazer um programa funcional: Setup e Loop (VIANNA e LIMA, 2014).

1.3.15.3 Aplicações

A principal finalidade do Arduino num sistema é facilitar a prototipagem, implementação ou emulação do controle de sistemas interativos, a nível doméstico, comercial ou móvel, da mesma forma que o CLP controla sistemas de funcionamento industriais. Com ele é possível enviar ou receber informações de basicamente qualquer sistema eletrônico, como identificar a aproximação de uma pessoa e variar a intensidade da luz do ambiente conforme a sua chegada. Ou abrir as janelas de um escritório de acordo com a intensidade da luz do sol e temperatura ambiente. Os campos de atuação para o controle de sistemas são imensos, podendo ter aplicações na área de impressão 3D, robótica, engenharia de transportes, engenharia agrônômica, musical ou até mesmo em ambiente escolar, para o desenvolvimento de experimentos otimizando assim a aprendizagem dos alunos tanto na área de física quanto de química (SOUZA et al., 2012).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACMITE MARKET INTELLIGENCE. Global Surfactant Market: Market, Products, Applications, Innovations, Chances & risks, Competition, **Prospects to 2020**. Vol 1. Ratingen, P. 254., 2013.

AÇIKEL et al., Cengiz Han. Health belief model scale for cervical cancer and Pap smear test: psychometric testing. **Journal of advanced nursing**, v. 67, n. 2, p. 428-437, 2011.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnología Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**, Vol. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

AL-BAHRY, S. N. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.

ALIZADEH-SANI, Mahmood; KHEZERLOU, Arezou; EHSANI, Ali. Fabrication and characterization of the bionanocomposite film based on whey protein biopolymer loaded with TiO₂ nanoparticles, cellulose nanofibers and rosemary essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 300-315, 2018.

ANISZEWSKI, Erick et al. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 235-245, 2010.

AKHTAR, M.; LENTZ, M. J.; BANCHETTE, R. A.; KIRK, T. K. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **TAPPI J.** v. 80, p. 161-164, 1997.

ASCI, Y., NURBAS, M, AND ACIKEL, Y.S. (2010.) Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metals ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant. **J. Environ Manage** 91,724-731.

BARKAY, T. et al. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2697-2702, 1999.

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **J. Ind. Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 1071-1078, 2008.

BANAT, Ibrahim M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BENTO, F. M. et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 249-255, 2005.

BHAISARE, M. L. et al., Fluorophotometric determination of critical micelle concentration (CMC) of ionic and non-ionic surfactants with carbon dots via Stokes shift. **Talanta**, v. 132, p. 572-578, 2015.

Bod garage. Nº 25 – 2013. Disponível em: <http://bodgarage.repofy.com/?p=959> Acesso em: 20/10/2018

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agentes for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. V. 152, p. 41-52, 1999.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*, v. 152, p. 41-52, 1999. BANAT, I. M.; MAKKAR, M. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BUENO, Silvia Messias; SILVA, Adriana Navarro da; GARCIA-CRUZ, Crispin Humberto. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, p. 1572-1577, 2010.

BUTT, Haider et al., Morpho Butterfly-Inspired Nanostructures. **Advanced Optical Materials**, v. 4, n. 4, p. 497-504, 2016.

CÂMARA, JDA; SOUSA, MASB; LIMA, A. M. Avaliação da biodecomposição de óleo bruto e diesel através da pseudomona aeruginosa. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 7800-7808, 2015.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMEOTRA, SS; MAKKAR, RS; KAUR, J; MEHTA, SK; Síntese de biosurfactantes e seus vantagens para os microrganismos e para a humanidade. **Avanços em Medicina Experimental e Biologia**. v.672, p.261-280, 2010.

CAMPOS, Jenyffer M. et al., Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234-3252, 2015.

CARDINAL, E. V.; HEDRICK, L. R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid contente. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, p. 609-612, 1948.

CHEN, WC; JUANG, RS; WEI, YH Aplicações de um biosurfactante lipopeptídico, surfactina, produzido por microorganismos. **Revista de Engenharia Bioquímica**. v.103, p.158-169, 2015.

COHEN, R et al., Effect of Rhamnolipids on Pulmonary Surfactant Foam Films. **Langmuir Article**. V. 26. Issue 12, p. 9423-9428, 2010.

CHAMAKH-AYARI, Rym et al. In vitro evaluation of a soluble Leishmania promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e92708, 2019.

CHEBBI, Alif et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 122, p. 128-140, 2017.

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

COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbiology science**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

COSTA, S. G. V. A. O. et al., Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ind Microbiology Biotechnology* 36, p. 1063-1072, 2009.

CZAPLICKA, M.; CHMIELARZ, A. Application of biosurfactants and non-ionic surfactants for removal of organic matter from metallurgical lead-bearing slime. *Journal of Hazardous Materials*, v. 163, p. 645-649, 2009.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1339-1345, 2007.

DE, S. et al. A review on natural surfactants. *RSC advances*, v. 5, n. 81, p. 65757-65767, 2015.

DECESARO, Andressa et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Biosurfactants: production, properties, applications. **Editora Marcel Decker, Nova York**, 1993, cap. 3. Disponível em: www.books.google.com.br. Acessado em: 10/06/2011. cf

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

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 61-69, 2001.

ELSHESHTAWY, Yasser. FROM SOUQS TO EMPORIUMS: THE URBAN TRANSFORMATION OF ABU DHABI. *Open House International*, v. 38, n. 4, 2013.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactante: vantagens e desvantagens. *Química e Sociedade*, v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. *Química Nova*, v.31, n.8, 2008.

FRAZZETTI, A., CAREDDA, P., RUGGERI, C., COLLA, P.L., TAMBURINI, E., PAPANICOLAOU, M., AND BESTETTI, G. (2012). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. Strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 75,801-807, 2012.

FRANZETTI, A., et al., Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere*, v. 62, p. 474-480, 2006.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Nº 25 – 2013. Disponível em: <http://www.revistafi.com/materias/324.pdf> . Acesso em: 20/10/2018.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K.; microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science*. V. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current opinion in biotechnology**, v. 30C, p. 66-72, 1 jul. 2014.

GUIDI, Murilo Cezari; ROMERO, Oldrich Joel. Numerical Simulation of Surfactant Flooding in Petroleum Reservoirs. **IEEE Latin America Transactions**, v. 16, n. 6, p. 1700-1707, 2018.

HUA, Z. et al. 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.

HAUSMANN, R.; SYDALTK, C. Tipos e Classificação de Surfactantes Microbianos. Cap 1. Em: KOSARIC, N; SUKAN, FV Biosurfactants: Produção e utilização - processo, tecnologias e economia. **CRC Press: Boca Raton**. 2015, 389p.

HELMY, Q.; KARDENA, E.; FUNAIZU, U.; WISJUPRAPTO. Strategies toward comercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. **International Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 66-68, 2011.

INAKOLLU, S., HUNG, H., AND SHREVE, G.S. (2004). Biosurfactant enhancement of microbial degradation of various structural classes of hydrocarbon in mixed waste systems. **Environ. Eng. Sci.** 21,463–469.

INÊS, Mnif SAHNOUN, Rihab; GHRIBI, Dhouha. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, 2017

JAYACHANDRAN, Satish; KALAIIGNANAM, Kartik; EILERT, Meike. Product and environmental social performance: Varying effect on firm performance. **Strategic Management Journal**, v. 34, n. 10, p. 1255-1264, 2013.

JORDAN, R. N.; NICHOLS, E. P.; CUNNINGHAM, A. B. The role of (bio) surfactante sorption in promoting the bioavailability of nutrientes localized at the solid-water interface. **Water Science and technology**, v. 39, n. 7, p. 91-98, 1999.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C; JHA, S .; YADAV, S .; NERURKAR, A.; DESAI, AJ Biosurfactante produção utilizando melão e soro sob condições termofílicas. **Bioresource Technology**, v.99, n.1, p.195–199, 2008.

KANMANI, Paulraj; LIM, Seung Taik. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1099-1106, 2013.

KAKUGAWA, Yoichiro et al. Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10718-10723, 2002.

KANG, S.W., KIM, Y.B., SHIN, J.D., AND KIM, E.K. (2010). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. **Appl. Biochem. Biotechnol** 160,780–790.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology Biotechnology**, v. 39, p. 295-304, 2001.

KHOPADE, Ajay Jaysingh; BHOWMICK, Subhas Balaram; ARULSUDAR, Natarajan. Nanodispersion. **U.S. Patent** n. 8,586,062, 19 nov. 2013.

KIRAN, G. Seghal et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

KOSARIC, N., CAIRNS, W.L., AND GRAY, N.C.C. (1987). **Biosurfactants and Biotechnology**, Marcel Dekker, New York.

LANG, Siegmund. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n. 1-2, p. 12-20, 2002.

LIMA, C. J. B.; RIBEIRO, E. J.; SÉRVULO, E. F. C.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Biosurfactant Production by *Pseudomas aeruginosa* grown in Residual Soyben Oil. **Applies Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 156-168, 2009.

LUNA, J. M. et al., G. M. Economic optimized médium for tenso-active agente production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 2463-2476, 2011.

LUNA, J. M., et al., Characterizatio, surfasse properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

LUNA, J. M.; et al., Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivates in olw-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2015.

MAIA, Patrícia et al. Production of a Biosurfactant by *Cunninghamella echinulata* Using Renewable Substrates and Its Applications in Enhanced Oil Spill Recovery. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 63, 2018.

MAKKAR, M. 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 RS; CAMEOTRA SS Uma atualização sobre o uso de substratos não convencionais para biossurfactantes produção e suas novas aplicações. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.58, p.428-434, 2002.

MAKKAR, M. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, p1-5, 2011.

MONTERO-RODRÍGUEZ, Dayana et al. Conversion of agro-industrial wastes by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 into lipids suitable for biodiesel production. **Chemical Engineering**, v. 49, 2016.

MONK, S. Programação com Arduino: começando com sketches. **Porto Alegre: Bookman**, 2015. 247 p.

MNIF, Inès; GHRIBI, Dhouha. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Peptide Science**, v. 104, n. 3, p. 129-147, 2015.

MULQUEEN, P. (2003). Recent advances in agrochemical formulations. **Adv Colloid Interface Sci.** 106,83–107.

MUKHERJEE, Biswanath. Optical WDM networks. Springer Science & Business Media, 2006.

MULLIGAN, C.N., and Gibbs, B.F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. **Proc. Indian Nat. Sci. Acad.** 1,31–55.

MUKHERJEE, S., DAS, P., AND SEN, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.** 24,509–515.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quimica. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOORDMAN, W. H.; JANSEN, D. B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002.

NISHIO, E., ICHIKI, Y., TAMURA, H., MORITA, S., WATANABE, K., AND YOSHIKAWA, H. (2002). Isolation of bacterial strains that produce the endocrine disruptor, octylphenol diethoxylates, in paddy fields. **Biosci Biotechnol Biochem.** 66,1792–1798

OBAYORI, O.S., ILORI, M.O., ADEBUSOYE, S.A., OYETIBO, G.O., OMOTAYO, A.E., AND AMUND, O.O. (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 1615-1623.

ORDÓÑEZ, Nelson G. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma: an update. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 129, n. 11, p. 1407-1414, 2005.

PENFOLD, Christopher A.; WILD, David L. How to infer gene networks from expression profiles, revisited. **Interface focus**, v. 1, n. 6, p. 857-870, 2011.

PIRÔLLO, Maria Paula Santos. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006.

PUCHKOV, E. O. The mycocidal, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola* is a new type of cellobiose lipid with detergent features. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1558, n. 2, p. 161-170, 2002.

PUNNIYAKOTTI, J.; PONNUSAMY, V. Depth-wise distribution of ²³⁸U, ²³²Th and ⁴⁰K in sand samples of high background radiation areas (Tamilnadu coast), India. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 311, n. 3, p. 1875-1881, 2017.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. *Biotechnol. Prog.*, v. 18, p. 1277-1281, 2002. RAHMAN, PKSM; GAKPE, E. **Produção, caracterização e aplicações de biossurfactantes - Reveja. Biotecnologia**, v.7, n.2, p.360-370, 2008.

RAHMAN, K.S.M., RAHMAN, T.J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., MARCHANT, R., AND BANAT, I.M. (2003). The potential of bacterial isolates for emulsification with range of hydrocarbons. **Acta Biotechnol.** 4,335–345.

RAMAKRISHNA MATTE, H. S. S. et al. MoS₂ and WS₂ analogues of graphene. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 49, n. 24, p. 4059-4062, 2010.

ROCHA, Maria VP et al. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295-1299, 2017.

ROSTAS, M., AND BLASSMANN, K. (2009). Insects had it first: surfactants as a defense against predators. *Proc R Soc .* 276,633–638.B

ROMBOLÁ-CALDENTEY, B. et al. Vacuolar NHX antiporters: understanding structure-function relationships and regulation. 2016.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, . 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

RUCKENSTEIN, E.; NAGARAJAN, R. **The Journal of Physical Chemistry**, 79 (1975) 2622-2626.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21 st Century. **Internacional jornal of molecularscinces**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 1, p. 1-14, 2011.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, Raquel; INIESTA-BONILLO, M. Ángeles. The concept of perceived value: a systematic review of the research. **Marketing theory**, v. 7, n. 4, p. 427-451, 2007.

SAHOO, Prasanta; DAS, Suman Kalyan. Tribology of electroless nickel coatings—a review. **Materials & Design**, v. 32, n. 4, p. 1760-1775, 2011.

SATPUTE, Surekha K.; PŁAZA, Grażyna A.; BANPURKAR, Arun G. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, p. 46-54, 2017.

SEKHON-RANDHAWA, et al., Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 454, 2014.

SHEKHAR, Prateek et al. Integrating quantitative and qualitative research methods to examine student resistance to active learning. **European Journal of Engineering Education**, p. 1-13, 2014.

SHEPHERD, G. J. FITOPAC 1: manual do usuário. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 78 p, 1995.

SHAH, Pratik; BJORNSTAD, Petter; JOHNSON, Richard J. Hyperuricemia as a potential risk factor for type 2 diabetes and diabetic nephropathy. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 4, p. 386-387, 2016.

SILVA, N. M. P. R. et al., Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cst substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 132-139, 2014.

SOUZA, J. J. I. et al., Sistema de Monitoramento do pH e Temperatura por meio de Tecnologias Livres para a Proteção dos Corpos d'Água do Delta do Parnaíba. In: Encontro Regional de Computação dos Estados Ceará, Maranhão e Piauí, 2012, São Luís. IV **Jornada de Informática do Maranhão / ERCEMAPI**. São Luís-MA, 2012.

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

SOUZA, P. M. et al. Factorial Design based Medium Optimization for the Improved Production of Biosurfactant by *Mucor polymorphosphorus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 11, p. 898-905, 2016.

SYAHRIANSYAH, Ummul Khair Mohd; HAMZAH, Ainon. Determination of optimum conditions and stability study of biosurfactant produced BY *Bacillus subtilis* UKMP-4M5. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 20, n. 5, p. 986-1000, 2016.

SUTHAR, Surindra; SINGH, Sushma. Feasibility of vermicomposting in biostabilization of sludge from a distillery industry. **Science of the total environment**, v. 394, n. 2-3, p. 237-243, 2008.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, ed. 84, p. 917-930, 2000.

TILAY, Ashwini; ANNAPURE, Uday. Novel simplified and rapid method for screening and isolation of polyunsaturated fatty acids producing marine bacteria. **Biotechnology research international**, v. 2012, 2012.

UZOIGWE, C. et al., Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches, *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2015.002456(APR), 1-6 (2015).

VATSA, Parul et al. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 12, p. 5095-5108, 2010.

VAN DER GRAAF, Schroen; SCHROEN, C. G. P. H.; BOOM, R. M. Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review. **Journal of Membrane Science**, v. 251, n. 1-2, p. 7-15, 2005.

VIANNA, P.V.P.V.; LIMA, E.A.P. Aplicação Do Arduíno No Monitoramento Ambiental. In: XIX Jornada em Engenharia Química. Anais da XIX Jornada em Engenharia Química. Uberaba – MG, 2014. VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. **Biosurfactants-types, sources and applications. Res. J. Microbiol.** 2015, 10, 181-192.

WHANGA, L. M.; LIUC, P. W. G.; MAA, C. C.; CHENGA, S. S. Application of biosurfactants, rhamnolipi, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 155-163, 2008.

WILLENBACHER, Johannes et al. Pd-complex driven formation of single-chain nanoparticles. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 24, p. 4358-4365, 2015.

YOUNG, K. L.; PERSONICK, M. L.; ENGEL, M.; DAMASCENO, P. F.; BARNABY, S. N.; BLEHER, R.; LI, T.; GLOTZER, S. C.; LEE, B.; MIRKIN, C. A. **Angewandte Chemie International Edition**, 52 (2013) 13980-13984.

ZHANG, H.; XIANG, H.; ZHANG, G.; CAO, X.; MENG, Q. Enhanced treatment of waste frying oil in na activated sludge system by addition of crude rhamnolipid solution. **Journal of Hazard Material**, v. 167, p. 217-223, 2009.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS E MONITORAMENTO COMPUTORIZADO DA TEMPERATURA

Trabalho submetido para ser publicado na revista: **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**

RESUMO

Biossurfactantes são compostos anfipáticos produzidos por micro-organismos que têm capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais, além de serem capazes de formar emulsões estáveis. O objetivo desse trabalho foi produzir um biossurfactante e bioemulsificante, avaliando a influência da temperatura e suas oscilações dentro do processo, utilizando a monitoração digital computadorizada com a plataforma do arduíno e o sensor de temperatura à prova d'água DS18B20. Com enfoque na bioconversão de resíduos agroindustriais (óleo de soja residual, manipueira e milhocina) foram estabelecidas concentrações para o planejamento experimental do DCCR de 23, tendo como variável resposta a produção de biossurfactante e/ou bioemulsificante. Os resultados mostraram que o *Sycephalastrum racemosum* UCP 1302 apresentou excelente capacidade de produção de biossurfactante no ensaio 7, reduzindo a tensão superficial da água de 72 para 30,9 mN/m. Enquanto bioemulsificante no ensaio 3, apresentou índice de emulsificação de 97,58%. A composição bioquímica preliminar mostrou que o biossurfactante é composto por lipídios 53,56%, proteínas de 37,88% e carboidratos 8,56%, e bioemulsificantes por proteínas 45,72%, lipídios 42,19% e carboidratos 12,09% apresentando características de lipopeptídeos. Ambas as biomoléculas mostraram caráter aniônico, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de 2,5%. As biomoléculas foram avaliadas e mostraram eficiência quanto ao tamanho das partículas, viscosidade, estabilidade às variações de pH, concentração de NaCl e temperatura e excelente capacidade como agente molhante que indica possível aplicabilidade para o processo de Recuperação Microbiana de Petróleo Aprimorado (MEOR). *S. racemosum* apresentou excelente capacidade de produção de bioemulsificadores e boa capacidade de produção de biossurfactantes, utilizando conversão metabólica de resíduos agroindustriais, tornando o bioprocesso viável e com potencial na aplicação biotecnológica.

Palavras-Chave: Bioprocesso, Arduíno, Surfactante, Fungo Filamentoso, Biomoléculas.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic compounds produced by microorganisms that have the ability to reduce surface and interfacial tensions, and are capable of forming stable emulsions. The objective of this work was to produce a biosurfactant and bioemulsifier, evaluating the influence of temperature and its oscillations within the process, using digital computerized monitoring with the arduino platform and the temperature sensor DS18B20. Concentrations were established for the experimental design of the DCCR of 23, with the response variable being the biosurfactant and / or bioemulsifier production, with a focus on the bioconversion of agroindustrial residues (residual soybean oil, manipueira and maize). The results showed that *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 presented excellent biosurfactant production capacity in test 7, reducing the water surface tension from 72 to 30.9 mN / m. As a bioemulsifier in assay 3, it had an emulsification index of 97.58%. The preliminary biochemical composition showed that the biosurfactant consists of lipids 53.56%, proteins of 37.88% and carbohydrates 8.56%, and bioemulsifiers for proteins 45.72%, lipids 42.19% and carbohydrates 12.09% presenting characteristics of lipopeptides. Both biomolecules showed anionic character, presenting critical micellar concentration (CMC) of 2.5%. Biomolecules were evaluated and showed efficiency in particle size, viscosity, stability to pH variations, NaCl concentration and temperature and excellent wetting capacity indicating a possible applicability to the Enhanced Oil Microbial Recovery (MEOR) process. *S. racemosum* presented excellent bioemulsification capacity and good biosurfactant production capacity, using metabolic conversion of agroindustrial residues, making the bioprocess viable and with potential in the biotechnological application.

Key Words: Bioprocess, Arduino, Surfactant, Filamentous Fungus, Biomolecules.

1. INTRODUÇÃO

Os termos biossurfactantes e bioemulsificantes foram utilizados com referência ao mesmo nível de bioatividade. No entanto, compostos de elevado peso molecular e capazes de formar e estabilizar emulsões são referidos como bioemulsionantes ou bioemulsantes. Estes são polímeros de polissacarídeos, lipo-polissacarídeos, proteínas e lipoproteínas, enquanto os biossurfactantes são representados por compostos de baixo peso molecular, dentre os quais estão incluídos lipopeptídeos e glicolipídios (FRANZETTI et al.,2012; SOUZA et al; 2016; PUNNIYAKOTTI, 2017).

Os compostos anfifílicos ambientais extracelulares: biossurfactantes e bioemulsificantes são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, principalmente, por bactérias, seguido de leveduras e de forma mais escassa por fungos filamentosos. Esses compostos tensoativos apresentam diferentes estruturas químicas e uma eficiente e ampla condições extremas, como temperatura, pH e salinidade, demonstrando diferentes funções e aplicações. Neste sentido, justificam-se as inúmeras aplicações em diferentes setores industriais, tais como, de cosméticos, alimentos, detergentes, agricultura e medicina, sendo sua biodegradabilidade, um dos seus ativos mais importantes, pois evita problemas de toxicidade e acumulação nos ecossistemas naturais. (SEKHON-RANDHAWA et al.,2014; DECESARO et al., 2015; SANTOS et al., 2016, MAIA et al. 2018).

No entanto, os bioemulsificantes ainda não permitem uma competitividade com os emulsificantes químicos, pois seu custo de produção ainda é elevado em função da utilização de substratos, que elevam os custos acima de 30 a 40% do seu valor. Assim, o sucesso no desenvolvimento industrial da produção de biossurfactantes depende do uso de substratos alternativos e de baixo custo, empregando resíduos agroindustriais, tornando-se assim uma importante estratégia para redução dos custos de produção (SILVA, 2012; SATPUTE et al., 2017).

Assim, o aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais vem se apresentando como uma alternativa atrativa para exploração, como fonte nutricional para a produção de insumos de elevado valor agregado. Neste contexto, os resíduos de natureza hidrofílica são considerados vantajosos, tendo em vista a possibilidade de bioconversão por fungos filamentosos o que possibilita maior rendimento de bioprodutos (MONTERO-RODRÍGUEZ, et al., 2016).

O objetivo fundamental deste trabalho foi utilizar *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 para produzir um bioemulsificante aplicando uma metodologia ecologicamente correta que através da bioconversão dos resíduos agroindustriais tornam o bioprocessamento econômico e sustentável.

2. METODOLOGIA

2.1 Micro-organismo

Os estudos foram realizados com o fungo filamentosso *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302, isolado de solo da Serra Talhada do Estado de Pernambuco, Brasil, pertencente à Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e registrada no World Federation for Culture Collection (WFCC). A cultura foi mantida em meio Sabouraud Dextrose Ágar à 5 °C.

2.2 Substratos agroindustriais

Os substratos utilizados serão a milhocina, subproduto do beneficiamento do milho da indústria Corn Products Ltda (Vitória de Santo Antão – PE, Brasil) e o óleo de soja residual que será gentilmente cedido pelo comércio informal. E a manipueira da casa de farinha de cidade de Pombos, PE.

2.3 Produção do biossurfactante e do bioemulsificante

O cultivo de *S. racemosum* foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio constituído por milhocina, manipueira e óleo de soja residual de acordo com as concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial DCCR 2³ (Tabela 1). Todos os meios foram acrescidos de uma base de sais contendo NH₄NO₃ (0,1%); KH₂PO₄ (0,02g/L) e MgSO₄ (0,02g/L). O pH do meio de produção foi ajustado a 6,0 por adição de NaOH 1 M ou solução de 1M de HCl e o inóculo correspondeu a 10% do cultivo contendo 10⁸cel/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 96 horas, à temperatura de 28°C. Após esse período a cultura foi para centrifuga a 8000 rpm, seguida de filtração em papel Wathmann N^o1, a fim de separar as células do líquido metabólico. O líquido metabólico livre de células foi utilizado para as seguintes determinações de: proteínas totais, consumo da fonte de carbono, tensão superficial, atividade e índice de emulsificação e cinética de crescimento e produção do bioemulsificante.

2.4 Planejamento experimental

Foi utilizado um planejamento fatorial DCCR de 2^3 (Tabela 1), 8 pontos fatoriais, 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações dos resíduos agroindustriais foi utilizado o software STATISTIC versão 6.0 da Statsoft®.

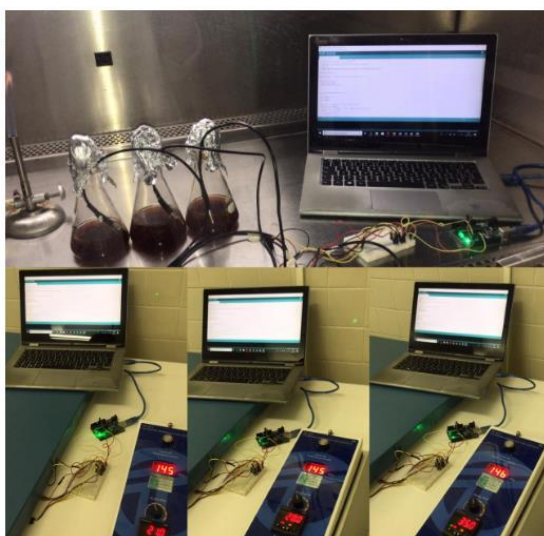
Tabela 1. Planejamento fatorial DCCR 2^3

Fatores	-1,68	-1	0	1	1,68
Milhocina (%)	2,47	3,5	5,0	6,5	7,52
Manipueira (%)	2,47	3,5	5,0	6,5	7,52
Óleo de soja pós fritura (%)	2,47	3,5	5,0	6,5	7,52

2.5 Determinação da temperatura por Arduino

A temperatura foi determinada pelo sensor DS18B20 com o auxílio do Arduino Uno (Figura 1) a cada 10 min., com as programações disponíveis no NPCIAMB (Núcleo de Pesquisa de Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco). Nas fermentações com temperaturas a 21, 28 e 35°C a fonte alimentação foi um carregador de 5 V e foi utilizado um cartão microSD para armazenar os dados e um computador com fonte de alimentação e armazenamento.

Figura 1. Monitoramento computadorizado da fermentação através do Arduino Uno.



Foram adicionadas duas bibliotecas ao software do arduino, OneWire e DallasTemperature. Essas duas bibliotecas trabalharam em conjunto para extrair os dados do sensor de temperatura à prova d'água DS18B20. O sensor DS18B20 pode efetuar leituras de temperaturas numa faixa de -50°C até 125°C com precisão de até $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e enviar as informações para o microcontrolador utilizando apenas 1 fio. Cada sensor possui um endereço físico (identificado pela biblioteca OneWire), assim pôde-se colocar vários sensores como o demonstrado na Figura 2 em um mesmo barramento, utilizando uma única porta do microcontrolador (THOMSEN, 2015).

Figura 2. Sensor DS18B20 submerso na fermentação por *C. phaeosphora* e isolado



Fonte: adaptado de THOMSEN, 2015.

2.6 Determinação do pH

Foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310) para a determinação do pH das alíquotas coletadas dos meios de produção livre de células.

2.7 Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação do sobrenadante livre de células foi analisado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987). Os substratos hidrofóbicos utilizados foram óleos vegetais (soja, milho e soja pós-fritura) e derivados de petróleo (diesel, óleo de motor e óleo de motor queimado), foram adicionados 1,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo e a mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas de repouso das emulsões formadas foi calculada a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicada por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem (IE_{24}).

2.8 Curva de crescimento da *Syncephalastrum racemosum*

Foram observados os biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos por *Syncephalastrum racemosum* nos períodos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas temperaturas de 21°C, 28°C e 35°C, analisando-se a biomassa, o índice de emulsificação e o pH.

2.8 Análise da microscopia óptica das emulsões

A análise das emulsões foi realizada após a adição de 1 mL de substratos hidrofóbicos e 1 mL de sobrenadante livre de células coletados em tubos de ensaio de 24 h, e em seguida foram agitados em vórtex em alta velocidade por 2 min. As emulsões foram observadas através de um microscópio óptico com uma ampliação de 10x e 100x, e uma câmera digital foi usada para capturar as imagens.

2.9 Determinação da viscosidade

O efeito do bioemulsificante na viscosidade da melhor emulsificação foi investigado em tubos de ensaio contendo 6 mL dos respectivos óleos e 2 mL de solução de bioemulsificante. Em seguida, os tubos foram agitados por 1 min e a viscosidade foi medida a 25 °C em um viscosímetro automático (Brookfield Middleboro, Middleborough, MA, EUA; TC 500). O surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle. Os resultados da viscosidade foram expressos em centipoise (Cp) e em porcentagem (%).

2.10 Estabilidade do bioemulsificante

A estabilidade do bioemulsificante foi avaliada no sobrenadante livre de células submetido a diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12), concentrações de NaCl (0%, 2%, 4%, 6%, 8 %, 10% e 12%) e temperaturas (0, 5, 28, 37, 50 e 100 ° C) por 10 min (BARROS et al., 2008).

2.11 Extração e rendimento do biossurfactante e bioemulsificante

O bioemulsionante de *R. mucilaginosa* foi extraído do sobrenadante isento de células utilizando o método de precipitação com etanol de acordo com Techaoei et al. (2007). Após a extração, o bioemulsificante bruto foi lavado duas vezes com água destilada e o rendimento expresso em g/L.

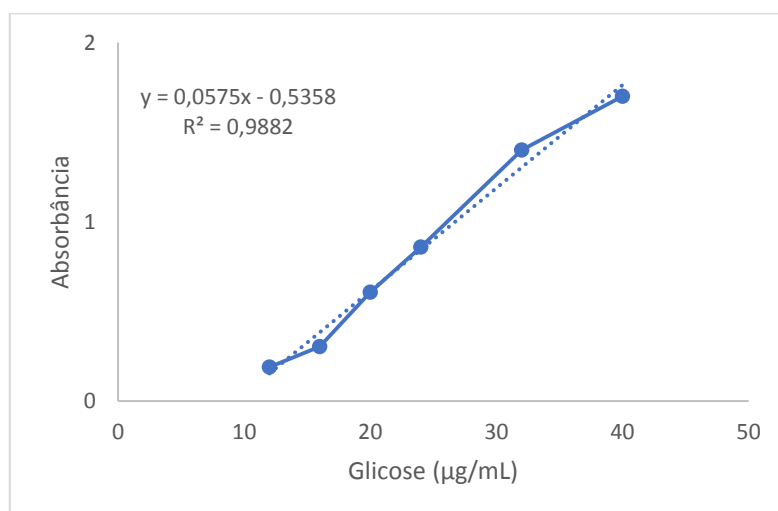
2.12 Determinação da carga iônica

A carga iônica do bioemulsificante foi investigada usando 100 mg da biomolécula solubilizada em 5 mL de água destilada. O caráter iônico foi determinado com um potenciômetro Zeta ZM3-D-G, Sistema Zeta Meter 3.0+, e as imagens diretas foram registradas em um vídeo Zeta Meter, San Francisco, CA, EUA.

2.13 Caracterização do bioemulsificante

A concentração de proteína no bioemulsificante isolado foi estimada usando o kit de teste de proteína total da Labtest Diagnóstica S.A., Brasil. O teor total de carboidratos foi estimado pelo método do ácido fenol-sulfúrico (Figura 3) (DUBOIS et al., 1956). O conteúdo lipídico foi determinado de acordo com Manocha et al. (1980): 0,5 g do material isolado foi extraído com clorofórmio: metanol em diferentes proporções (1: 1 e 1: 2, v / v). Os extratos orgânicos foram então evaporados sob vácuo e o teor de lipídios determinado por estimativa gravimétrica.

Figura 3. Curva de Calibração para determinação de carboidratos.



2.14 Determinação da Concentração Micelar Crítica – CMC

O bioemulsificante isolado foi solubilizado em água em diferentes concentrações (0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) e depois seus índices de emulsificação foram medidos. A CMC foi alcançada depois de observar um valor constante do índice de emulsificação.

2.15 Teste de molhabilidade

A molhagem foi testada em tecido de poliéster (2x2) cm, utilizando-se o teste de umedecimento em disco de lona, sendo analisado por gravimetria e por microscopia óptica, onde o controle foi a água (PRADHAN; BHATTACHARYYA, 2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Determinação da Tensão Superficial

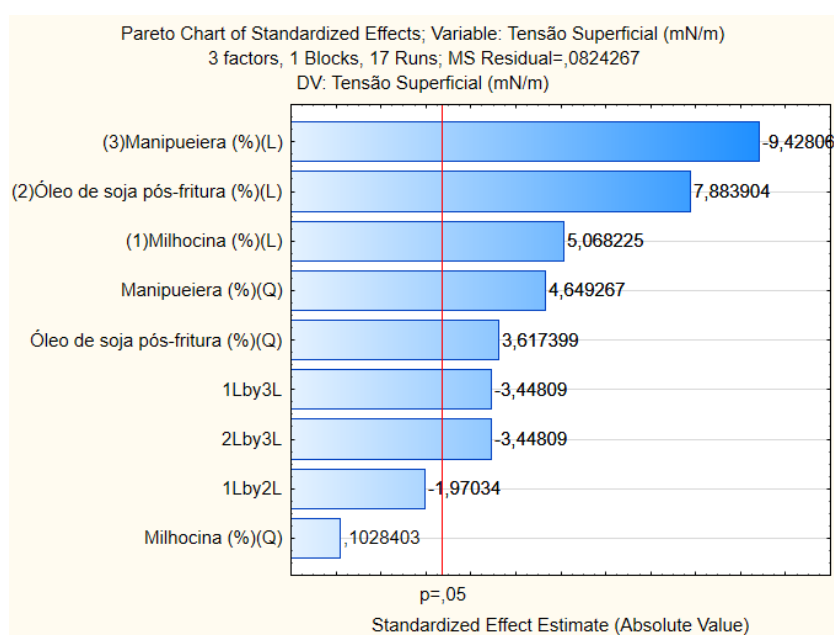
Os resultados obtidos revelaram que *Syncephalastrum racemosum* foi capaz de produzir um biossurfactante durante o crescimento em meio de baixo custo, indicados pelo ensaio 8, contendo milhocina (6,5%), manipueira (6,5%) e óleo de soja após fritura (3,5%). O composto diminuiu a tensão superficial da água de 72,0 mN/m para 31,4 mN/m. Este resultado demonstra que o biossurfactante produzido por *Syncephalastrum racemosum* possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial em comparação aos biossurfactantes produzidos pela *Cunninghamella echinulata* 37,1 mN/m de Maia (2018) e *C. antártica* (35,0 mN/m) de Shepherd (1995). A Tabela 2 apresenta a tensão superficial do líquido metabólico produzido por *S. racemosum*, segundo o planejamento fatorial, DCCR 2³.

Tabela 2. Tensão superficial de acordo com o planejamento fatorial, DCCR 2³, utilizando *Syncephalastrum racemosum* após 96 h de cultura sob agitação.

ENSAIOS	Milhocina (%)	Óleo de soja pós-fritura (%)	Manipueira (%)	Tensão superficial (mN/m)
1	3,5	3,5	3,5	34,6
2	3,5	3,5	6,5	34,9
3	3,5	6,5	3,5	32,5
4	3,5	6,5	6,5	33,7
5	6,5	3,5	3,5	32,7
6	6,5	3,5	6,5	33,9
7	6,5	6,5	3,5	30,9
8	6,5	6,5	6,5	34,0
9	2,477	5,0	5,0	34,3
10	7,522	5,0	5,0	33,6
11	5,0	2,477	5,0	34,1
12	5,0	7,522	5,0	32,1
13	5,0	5,0	2,477	31,6
14	5,0	5,0	7,522	34,1
15	5,0	5,0	5,0	34,1
16	5,0	5,0	5,0	34,2
17	5,0	5,0	5,0	33,9

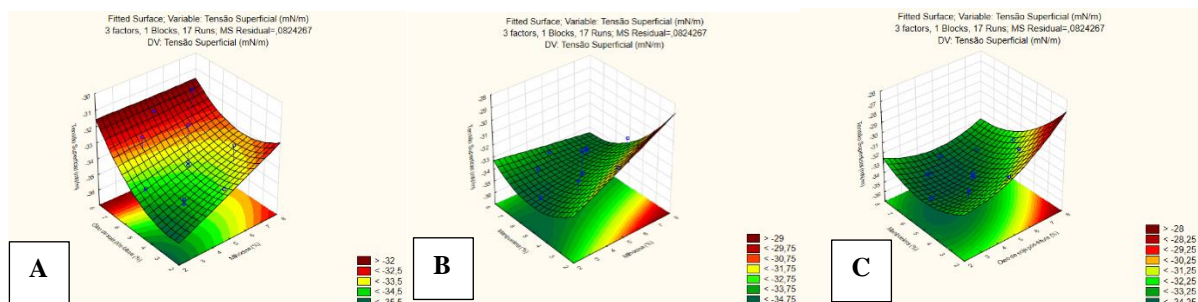
O efeito das variáveis independentes óleo de soja pós-fritura, milhocina, manipueira e suas interações na redução da tensão superficial é representado no Diagrama de Pareto (Figura 4) com um nível de confiança de 95%. De acordo com esse diagrama, apenas as interações dos substratos não apresentaram efeitos significativos na redução da tensão superficial. A manipueira apresentou efeito negativo na redução da tensão superficial, enquanto que o óleo de soja pós-fritura e a milhocina apresentaram efeito positivo. O ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

Figura 4. Diagrama de Pareto para determinar a influência dos resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina) na produção do biossurfactante.



Analisando os gráficos de superfície entre os substratos agroindustriais pode-se identificar que a milhocina apresentou efeito positivo na redução da tensão superficial enquanto que a manipueira apresentou efeito negativo (figura 5-A). Na figura 5-B é possível identificar que analisando-se apenas a influência da manipueira e do óleo de soja pós-fritura na redução da tensão superficial, a manipueira apresentou efeito negativo e o óleo de soja pós-fritura efeito positivo. No entanto a influência isolada do óleo de soja pós-fritura e da milhocina apenas efeito negativo quando utilizado os baixos níveis de óleo de soja pós-fritura e de milhocina simultaneamente (figura 5-C).

Figura 5. Gráfico de superfície resposta para análise da tensão superficial (A) milhocina X óleo de soja pós-fritura; (B) óleo de soja pós-fritura X maipueira; (C) milhocina X maipueira.



3.2 Produção de bioemulsificante por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 utilizando resíduos agroindustriais

O índice de emulsificação de diferentes substratos hidrofóbicos do bioemulsificante produzido por *Syncephalastrum racemosum* nas condições do planejamento fatorial, DCCR 2³, é apresentado na Tabela 3.

O *S. racemosum* demonstrou excelente habilidade em produzir bioemulsificante nas condição 3 (em meio contendo 3,5% de milhocina, 6,5% de óleo de soja residual e 3,5% de maipueira), e na condição 4 (em meio contendo 3,5% de milhocina, 6,5% de óleo de soja residual e 6,5% de maipueira). Nestas condições, foram obtidos os valores mais elevados do índice de emulsificação, de 98,51% e 95,79% com óleo de motor queimado (Tipo I) nas condições 3 e 4, respectivamente (Tabela 3).

De acordo com Willumsen e Karlson (1997) e Ahmad et al. (2016) são considerados valores significativos de índice de emulsificação (E24) se for igual acima de 50%. Diante disso, foram descartados os óleos soja pós-fritura e o óleo diesel, pois não formaram emulsão nesse processo. E pode-se observar que os percentuais de índice de emulsificação (Tabela 3) para o óleo de milho, óleo de soja, óleo de soja pós-fritura e óleo de motor 'in natura' não foram semelhantes ao óleo de motor queimado, sugerindo que a atividade de emulsificação depende da afinidade do bioemulsificante com os substratos hidrocarbonados, que segundo Luna et al. (2013) essa afinidade envolve a interação direta com o próprio hidrocarboneto.

O *S. racemosum* apresentou índices de emulsificação superior ao que foi obtido por Silva et al. (2014) com a *Cunninghamella echinulata*, utilizando o óleo de motor queimado (80%) e com a *Penicillium 8CC2* que obteve índice de emulsificação de 61% obtido por Sena et al. (2014).

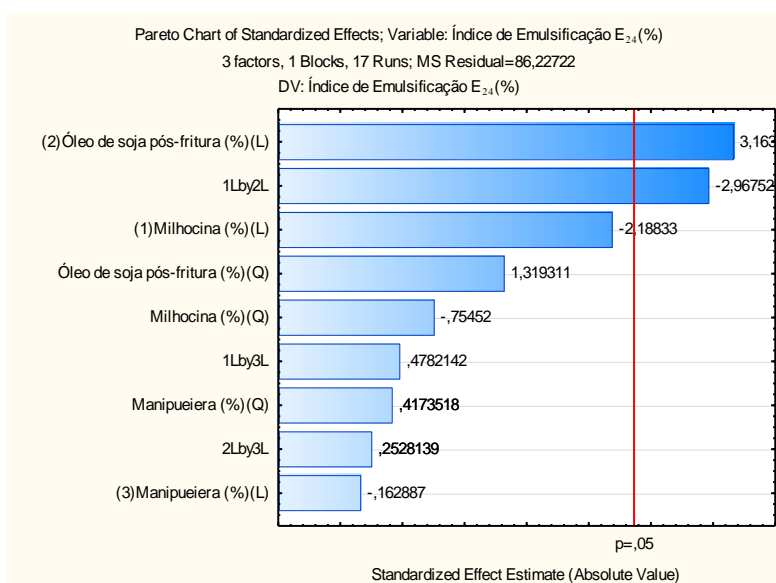
Tabela 3. Planejamento fatorial DCCR de 2³ para avaliar a influência do óleo de soja pós-fritura e da milhocina na produção de um bioemulsificante por *Syncephalastrum racemosum* UCP1302, avaliados durante 24 h pelo índice de emulsificação E₂₄ (%).

Índice de emulsificação E ₂₄ (%)				
ENSAIOS	Óleo de motor queimado	Óleo de milho	Óleo de soja	Óleo de motor in natura
1	55,07	55,70	51,34	68,14
2	54,25	63,66	53,11	54,76
3	98,51	53,79	54,15	50,00
4	93,70	71,50	59,18	63,66
5	55,34	50,00	52,14	53,49
6	53,49	53,66	61,28	72,50
7	52,50	64,50	54,75	51,28
8	61,28	52,50	52,35	53,12
9	53,17	71,28	66,67	65,45
10	55,45	53,12	64,37	66,67
11	64,37	51,28	76,67	95,45
12	76,67	53,12	65,52	62,07
13	65,52	65,45	51,22	66,67
14	61,42	54,67	54,42	65,52
15	62,67	57,45	53,41	61,42
16	60,92	53,07	52,11	66,67
17	62,11	56,67	55,00	64,92

De acordo com a análise estatística para a produção de bioemulsificante por 96h, o diagrama de Pareto de efeitos padronizados com o nível de 95% de confiança (Figura 6), pode ser observado que a variável independente (Óleo de Soja Pós-Fritura) foi positivamente significativa, em que individualmente o resíduo agroindustrial em nível mais alto demonstraram influência sobre a produção do bioemulsificante, O ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

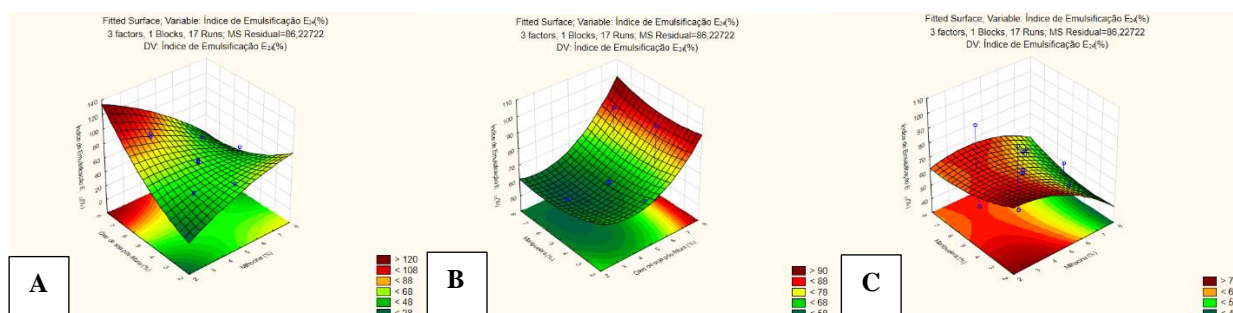
Vale salientar que, em muitos estudos a óleo de soja pós-fritura vêm demonstrado ser uma fonte promissora para o crescimento de micro-organismos, sendo incluída em meios de produção de bioemulsificantes e biossurfactantes (SOBRINHO et al., 2007, LUNA et al., 2011, SANTOS et al., 2013). Esses dados obtidos são bastante promissores, considerando que a produção biotecnológica de bioemulsificantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos, o que economicamente viabiliza o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (CAMEOTRA E MAKKAR, 1998; RODRIGUES et al. 2006; SOUZA et al., 2016).

Figura 6. Diagrama de Pareto para determinar a influência dos resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina) na produção do bioemulsificante



A figura 7A mostra que para se obter um melhor índice de emulsificação, deve-se utilizar na produção do bioemulsificante a maior concentração do substrato óleo de soja pós-fritura e a menor concentração do substrato milhocina. Analisando apenas a influência da milhocina e da manipueira na variável resposta IE_{24} , verificasse que utilizando a menor concentração de ambos os substratos pode-se obter um melhor bioemulsificante (Figura 7C). Já o gráfico (Figura 7B) que analisa o IE_{24} de acordo com os substratos óleo de soja pós-fritura e manipueira, nos mostra que utilizando concentrações maiores de óleo de soja pós-fritura se obtém um maior IE_{24} , porém as concentrações de manipueira foram irrelevantes.

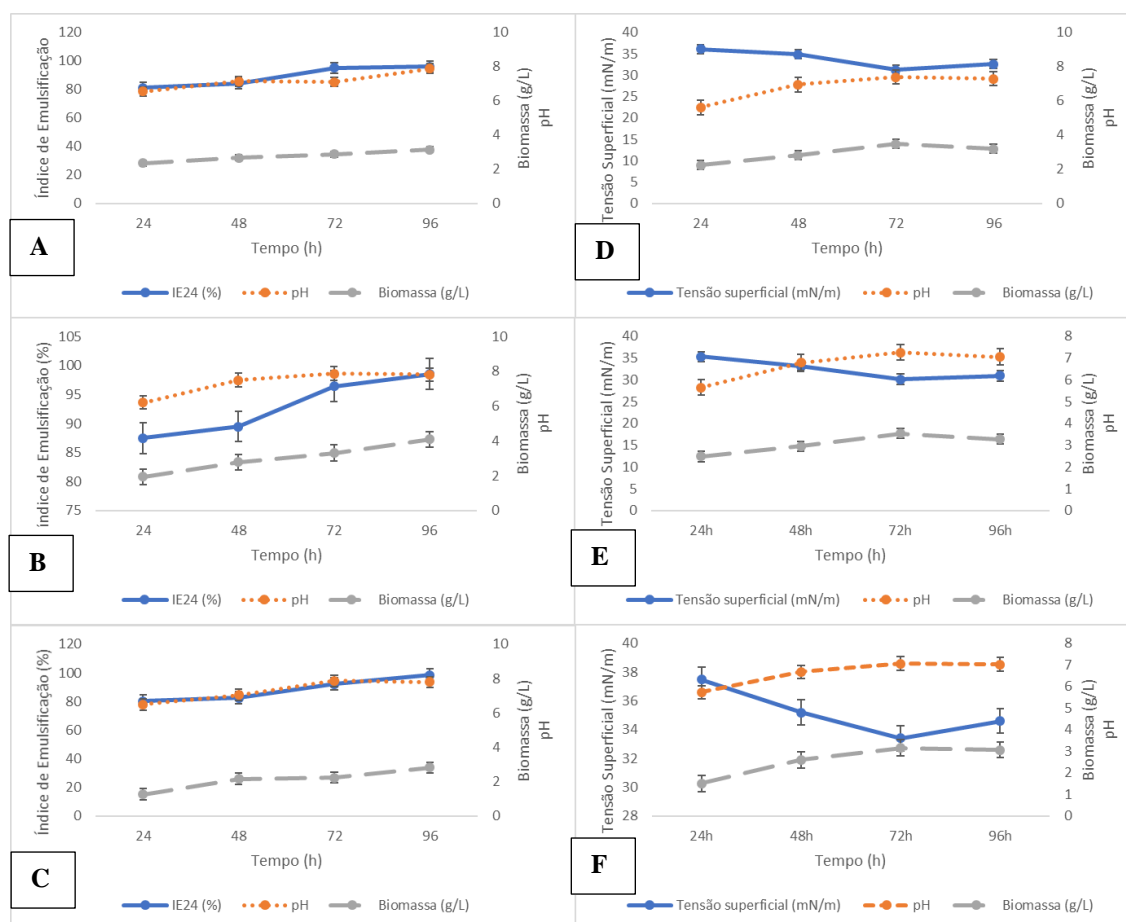
Figura 7. Gráfico de superfície resposta para análise do índice de emulsificação: (A) milhocina X óleo de soja pós-fritura; (B) óleo de soja pós-fritura X maipueira; (C) milhocina X manipueira.



3.3 Curva de crescimento do *Syncephalastrum racemosum*

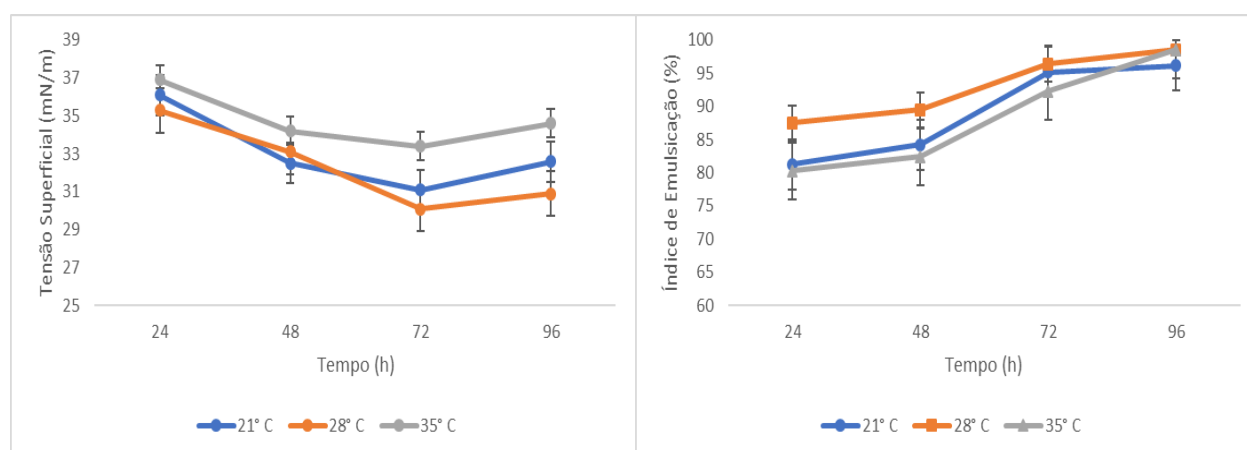
De acordo com a Figura 8 pode-se observar que a *Syncephalastrum racemosum* apresentou maior crescimento na temperatura de 28°C no período de 72 h para o biossurfactante e 96 h para o bioemulsificante com biomassas de 3,53 g/L e 4,10 g/L respectivamente, verifica-se que quanto maior o peso da biomassa, menor será sua tensão superficial e maior será a atividade emulsificante, assim como Bione et al. (2016) constatou com a *Cunninghamella phaeospora*. Analisando o pH, pode-se observar que em ambos os casos houve aumento de acordo com a elevação da biomassa, evidenciando que a *Syncephalastrum racemosum* torna o meio mais básico ao produzir o bioproduto.

Figura 8. Curva de crescimento do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1551 através da biomassa avaliando o pH e o índice de emulsificação (A-21°C, B-28°C, C-35°C). Curva de crescimento do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1551 através da biomassa avaliando o pH e a tensão superficial (D-21°C, E-28°C, F-35°C).



A influência da temperatura e do tempo na produção do biossurfactante é nitidamente observada na figura 9, tornando-se evidente que 72 h a 28°C é o tempo e a temperatura ótima para produção do biossurfactante, apresentando uma tensão superficial de 30,1 mN/m. Enquanto que para a produção do bioemulsificante, o tempo e temperatura ótima é de 96 h e 28°C, apresentando um índice de emulsificação de 97,58%.

Figura 9. Influência da temperatura e tempo de fermentação na produção do biossurfactante (A) e do bioemulsificante (B).

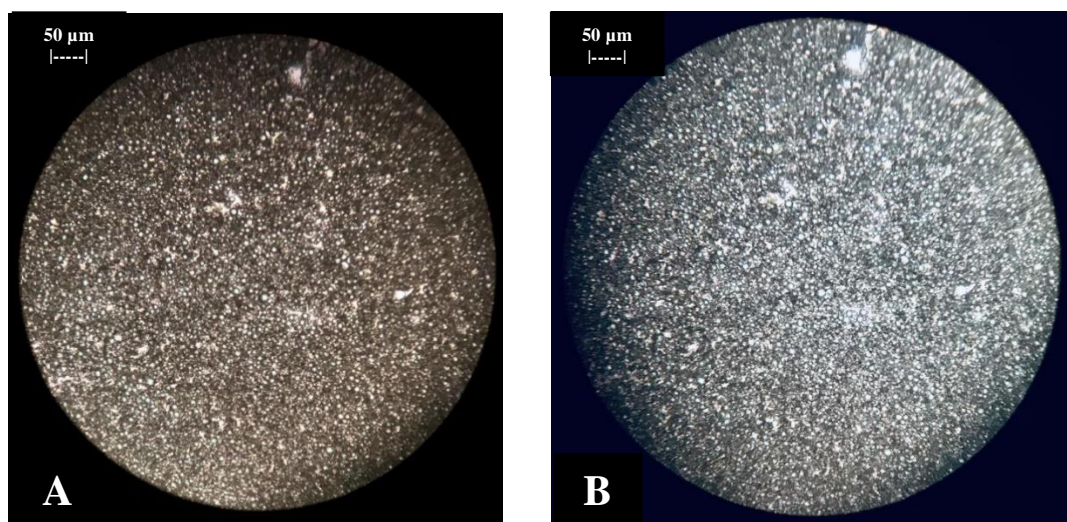


3.4 Caracterização das Gotículas de Emulsão Formadas Utilizado Óleo de Motor Queimado

As emulsões formadas pelo bioemulsificante, utilizando como substrato hidrofóbico o óleo de motor queimado, obtido da melhor condição no ensaio 3 do planejamento fatorial DCCR 2³ (tamanho do inóculo de 10 % com cultivo à 28° C e agitação de 150 rpm), em meio contendo 3,5% de milhocina, de maniveira 3,5% e 6,5 % de óleo de soja pós-fritura) a partir das emulsões formadas em 24 h pelo líquido metabólico (Figura 10A) e o surfactante químico SDS (Figura 10B), foram observadas em ambas as emulsões formaram gotas pequenas com insignificantes espaços vazios, demonstrando floculação sem tendência a coalescer para volumes maiores, apresentando uma maior homogeneidade entre as fases, sendo assim, uma maior tendência à estabilidade termodinâmica.

A análise da emulsão necessita de dois parâmetros importantes: o tamanho de gota da fase dispersa e sua concentração. Estes fatores influenciam a viscosidade, estabilidade e coalescência de acordo com Jillavenkatesa et al., (2001). As gotículas formadas da emulsão variam em tamanho, gerando uma distribuição de tamanhos de gotas. Na tabela 4, pode-se verificar a interação desses resultados neste estudo.

Figura 10. Observações microscópicas das gotas formadas a partir do bioemulsificante após 24 h: (A) Líquido metabólico do ensaio 3 com emulsão formado com óleo de motor queimado e (B) Surfactante Químico (SDS) com emulsão formada a partir do óleo de motor queimado.



Estabelecendo comparação entre a distribuição do tamanho das gotas e o índice de emulsificação (E_{24}) do bioemulsificante nos ensaios demonstrados na tabela 4, pode-se verificar que as gotículas variaram em tamanho e este fato influenciou na estabilidade da emulsão, como pode-se verificar o ensaio 3. Dickinson et al., (2009) estudaram experimentalmente a coalescência de gotas de tamanho milimétrico em interface óleo/água e observou que as gotas maiores estouraram mais rápido que as menores. Os autores afirmaram que a variedade de tamanhos das gotas depende do comportamento de coalescência com a deformabilidade da superfície da gota.

Tabela 4. Caracterização macro e microscópica de emulsões formadas em óleo de motor queimado do bioemulsificante em 24 h.

Ensaio	Substrato hidrofóbico	Características das emulsões	Diâmetro das gotas (μm)	Viscosidade (cp)	Estabilidade termodinâmica
3	Óleo de motor queimado (Tipo I)	Gotas Pequenas, Compactadas e Homogêneas	1,3–12,5	114,7	Estável
SDS*	Óleo de motor queimado	Gotas Pequenas, Compactadas e Homogêneas	2,5-12	114,1	Estável

3.5 Efeito do Bioemulsificante de *Syncephalastrum racemosum* na Viscosidade do Óleo Queimado de Motor

O líquido metabólico livre de células contendo o bioemulsificante foi capaz de formar um sistema estável com o óleo queimado de motor e reduzir a viscosidade deste óleo de 170 cP para 115,1 cP após 24h de repouso da amostra. Esta condição foi acompanhada durante 96h para identificar a capacidade do bioemulsificante em manter estável a viscosidade da emulsão formada. Os resultados demonstraram pequenas variações durante 96h, ficando evidente que o bioemulsificante do *Syncephalastrum racemosum* manteve a estabilidade da viscosidade em até 96h.

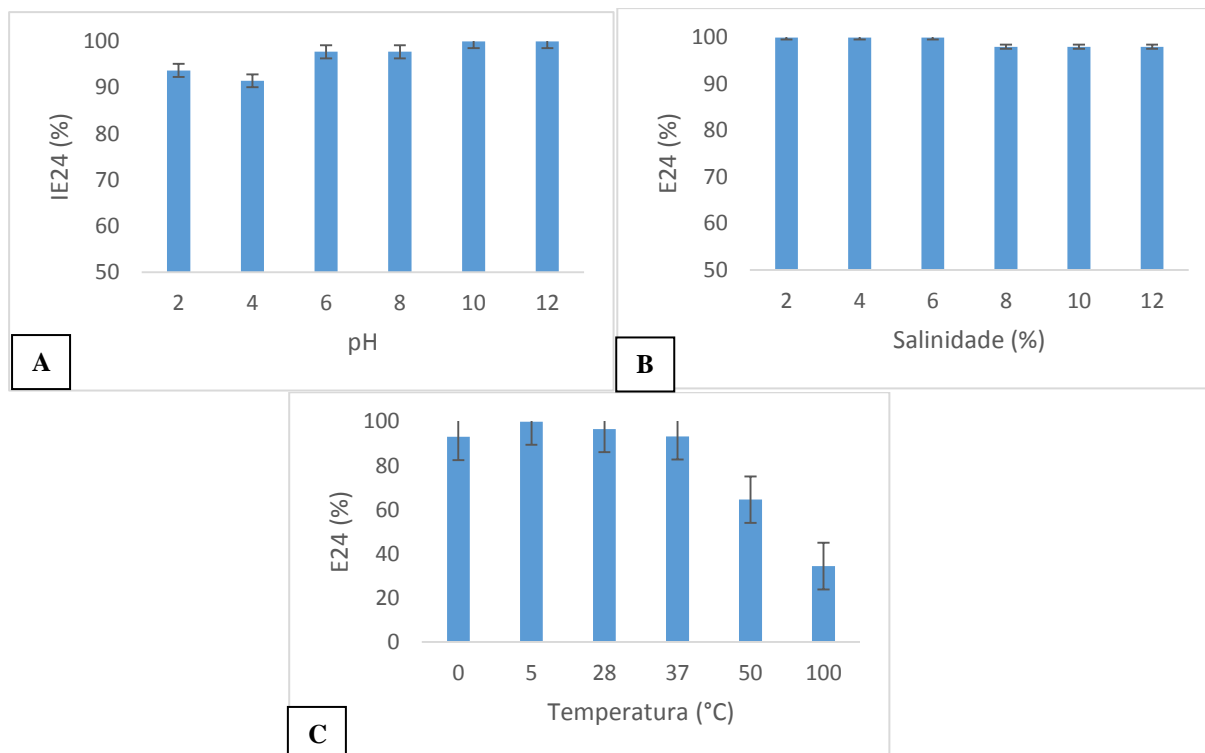
3.6 Estabilidade do Bioemulsificante Avaliada pela Viscosidade e Índice de Emulsificação

Segundo Willumsen e Karlson (1997), a principal característica dos agentes emulsificantes é sua capacidade de manter a estabilidade de substâncias com diferentes graus de polaridade representados por valores de emulsificação (E_{24}) acima de 50 % após 24 horas. Neste contexto, o bioemulsificante de *S.racemosum* foi capaz de manter elevada capacidade emulsificante com valores de IE_{24} acima de 90% após variações bruscas de pH (Figura 11A), obtendo valores significativos em toda faixa de pH testadas, resultados estes superiores aos de Souza et al., (2016), que não conseguiu obter valores positivos em todas as suas faixas de pH..

A estabilidade avaliada após exposição a elevadas concentrações de NaCl (Figure 11B), demonstra que as emulsões com óleo queimado de motor permaneceram estáveis em todas as concentrações testadas, com valores em torno de 99%. Esses resultados foram semelhantes ao estudo de Silva-Andrade et al., (2014), ao obterem bioemulsificante de *Cunninghamella echinulata* com capacidade emulsificante de até 12 % de NaCl após cultivo em meio formulado com milhocina e óleo residual de soja. Por outro lado, obteve melhores resultados que Souza et al. (2016) que conseguiu manter sua estabilidade emulsificante em apenas até 2% de NaCl.

A estabilidade térmica do bioemulsificante (Figure 11C) foi investigada entre 0 e 100°C. De acordo com os resultados, as emulsões com óleo de motor queimado mantiveram-se estáveis em até 37°C. Neste trabalho foi observado que as emulsões estáveis se apresentaram com valores térmicos de: 0° C, 5° C, 28° C e 37°C (com IE_{24} de 93,1%, 100%, 96,67%, 93,33% respectivamente) utilizando óleo de motor como substrato hidrofóbico.

Figura 11. A estabilidade do bioemulsificante produzido por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 de acordo com o índice de emulsificação (IE₂₄): pH (A); NaCl (B); e temperatura (C).

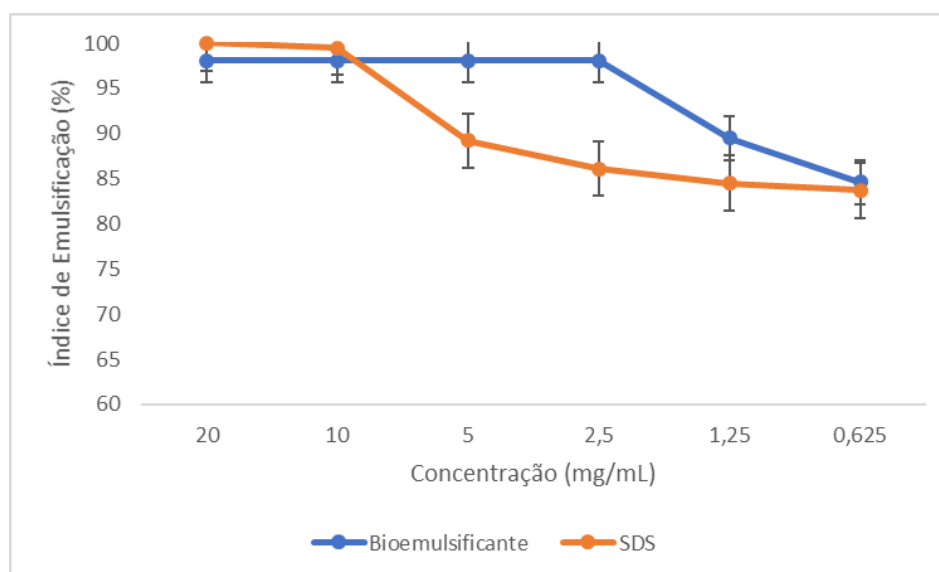


3.7 Concentração Micelar Crítica do Bioemulsificante

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração do surfactante que favorece a formação de micelas, uma agregação entre 50 e 100 moléculas de surfactante forma micelas. Micelas são formadas quando a parte lipofílica do surfactante não é capaz de formar pontes de hidrogênio com a solução aquosa, causando um aumento da energia livre do sistema (BUENO et al., 2010).

A CMC encontrada para o bioemulsificante produzido pelo *S. racemosum*, demonstrada na figura 12, foi de 2,5 mg/mL. Quanto mais baixa melhor será o bioemulsificante, pois será utilizado uma menor concentração. Sarubbo et al (2007) produziu um biotensioativo por *Mucor circinelloides* que obteve uma CMC de 2,5 mg/mL, sendo considerado um ótimo biossurfactante. O surfactante sintético (SDS) apresentou uma CMC (10 mg/mL) maior que a encontrada para o bioemulsificante produzido por *S. racemosum*, sendo o bioemulsificante um melhor emulsionante.

Figura 12. Concentração micelar crítica do bioemulsificante produzido por *Syncephalastrum racemosum* em comparação com o surfactante sintético (SDS).



3.8 Rendimento, caracterização preliminar e carga iônica do biossurfactante e bioemulsificante

Os testes realizados para determinar a composição bioquímica da biomolécula revelaram a presença de 53,56% de lipídios, 37,88% de proteínas e apenas 8,56% de e carboidratos rendimento de 0,9 g/L. Esses estudos sugerem que o biossurfactante sintetizado por *Syncephalastrum racemosum* é provavelmente classificado como um lipopeptídeo.

Já na caracterização bioquímicas preliminar do bioemulsificante aponta para que o agente examinado era um material composto por lipídeos totais (45,72 %), proteínas totais (42,19 %) e carboidratos totais (12,09 %) que sugerem que este classificado bioemulsificante como um lipopeptídeo e com rendimento de 1,66 g/L.

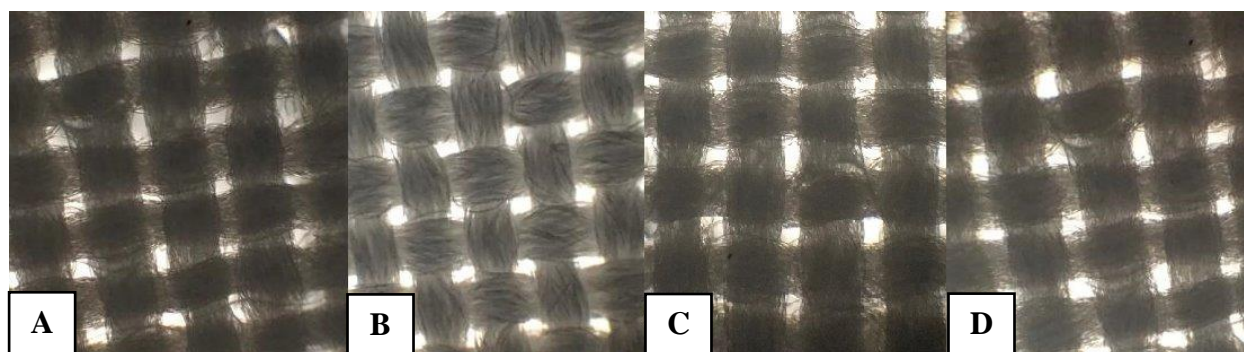
O potencial zeta determina a função da carga superficial da partícula que serve para prever e controlar a estabilidade de emulsões e suspensões coloidais (SARAFIN et al., 2014; CORTÉS-CAMARGO et al., 2016). Nestas condições estudadas, foi confirma os caracteres aniônicos tanto do biossurfactante como bioemulsificante produzidos.

3.9 Aplicação da propriedade de molhabilidade do biossurfactante e bioemulsificante

De acordo com a figura 13, através da cor da fibra do poliéster observada ao microscópio na objetiva de x10 pode-se verificar que o biossurfactante e o bioemulsificante foram dois fortes agentes umectantes, pois quanto mais escura a fibra maior a quantidade de líquido absorvida pela fibra de poliéster.

Analisando por gravimetria foi possível verificar que o poliéster foi capaz de absorver 0,16740 g de água e 0,16245 g do biossurfactante e 0,15907 g do bioemulsificante, evidenciando a capacidade molhante do biossurfactante e do bioemulsificante. De acordo com a figura 13 pode-se verificar microscopicamente esta constatação, onde a fibra de poliéster seco (Figura 13B) apresenta uma coloração cinza clara e a fibra com biossurfactante/bioemulsificante (Figura 13C e 13D, respectivamente) uma coloração cinza escura similar a fibra com água absorvida (Figura 13A).

Figura 13. Microscopia óptica da fibra do Fibra do Poliéster com água (A), Bioemulsificante (B) e Biossurfactante (C), Fibra do poliéster seca (D).



4. CONCLUSÕES

O *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 foi capaz de produzir biossurfactante e bioemulsificante com excelentes estabilidades térmicas, iônicas e do pH a partir da bioconversão de óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina como componente do meio de cultivo. O arduíno no monitoramento da temperatura se mostrou eficaz durante todo o processo de produção dos bioprodutos. Além disso, o bioemulsificante foi capaz de reduzir a viscosidade de petroderivado, o que indica sua possível aplicação em processos de biorremediação em solo e água. As biomoléculas também foram avaliadas quanto ao tamanho de suas partículas, demonstrando sua estabilidade termodinâmica e quanto a sua molhabilidade demonstrando eficiência que indica sua possível aplicabilidade para o processo de Recuperação Microbiana de Petróleo Aprimorado (MEOR), onde poderiam reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a superfície da rocha ou da água, o que resultaria na emulsificação e, por sua vez, melhoraria o deslocamento da incrustação dos poros e alteraria a molhabilidade, tornando o processo de recuperação mais eficiente. Por sua vez, a utilização dos resíduos agroindustriais para a produção de bioemulsificante por *S. racemosum* é uma metodologia ambientalmente adequada, uma vez que promove o aproveitamento de um resíduo regionalmente disponível, gerado pelas indústrias de alimentos e estabelecimentos comerciais. Este bioprocessos se mostrou sustentável e suas finalidades foram cumpridas: a de valorização dos substratos agroindustriais e a produção de biossurfactate e bioemulsificante.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE SILVA, Nadielly R. et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the northeast of Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

AHMAD, Zulfiqar et al. Estimation of biosurfactant yield produced by *Klebsiella* sp. FKOD36 bacteria using artificial neural network approach. **Measurement**, v. 81, p. 163-173, 2016.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008

BRADSHAW, L.J. Laboratory Microbiology. **Fourth Edition. USA**; p. 13-55, 1992.

CAMEOTRA, Swaranjit Singh; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

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

DAS, M.; DAS, S. K.; MUKHERJEE, R. K. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 3, p. 231-235, 1998.

DECESARO, Andressa et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DICKINSON, Eric. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, 2009

FRAZETTI, A., et al., Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. Strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere** 75,801-807, 2012.

LUNA, J. M. et al., Economic optimized médium for tenso-active agente production by *Candida spherica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 2463-2476, 2011.

KUYUKINA, M. S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v.46, p. 109-120, 2001.

LUNA, J. M et al., Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

MAIA, Patrícia et al. Production of a Biosurfactant by *Cunninghamella echinulata* Using Renewable Substrates and Its Applications in Enhanced Oil Spill Recovery. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 63, 2018.

MONTERO-RODRÍGUEZ, Dayana et al. Conversion of agro-industrial wastes by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 into lipids suitable for biodiesel production. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 49, 2016.

MENESES, D. et al. Produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense* utilizando resíduos agroindustriais. In: COBEQ 2016-XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química). **Associação Brasileira de Engenharia Química (ABEQ)**, p. 1-8., 2006.

RUFINO, R. D. et al. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, p. 117-122, 2013.

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

SANTOS, Danyelle KF et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 105, p. 43-50, 2013. SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21 st Century. **Internacional journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SARUBBO, Leonie A.; FARIAS, Charles BB; CAMPOS-TAKAKI, Galba Maria. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 68-73, 2007.

SATPUTE, Surekha K.; PŁAZA, Grażyna A.; BANPURKAR, Arun G. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, p. 46-54, 2017.

SEKHON RANDHAWA, Kamaljeet K.; RAHMAN, Pattanathu KSM. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 454, 2014.

SHEPHERD, Andrew; WINGHAM, Duncan J.; MANSLEY, Justin AD. Inland thinning of the Amundsen Sea sector, West Antarctica. **Geophysical Research Letters**, v. 29, n. 10, p. 2-1-2-4, 2002.

SILVA, N. M. P. R. et al., of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cst substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 132-139, 2014.

SOBRINHO, Humberto BS et al. **Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995.** Process Biochemistry, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2007.

SOUZA, P. M. et al. **Factorial Design based Medium Optimization for the Improved Production of Biosurfactant by *Mucor polymorphosphorus*.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 5, n. 11, p. 898-905, 2016.

PUNNIYAKOTTI, J.; PONNUSAMY, V. Depth-wise distribution of 238 U, 232 Th and 40 K in sand samples of high background radiation areas (Tamilnadu coast), India. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 311, n. 3, p. 1875-1881, 2017.

TECHAOEI, S. et al. **Preliminary Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms Isolated from Hot Spring and Garages in Northern Thailand.** Curr. Appl. Sci. Technol., v. 7, p. 38-43, 2007.

TIQUIA, S. M. TAM, N. F. Y., HODGKISS, I. J. **Effects of composting on phytotoxicity os spent pig-manure sawdust litter.** Environmental Pollution v.93, p.249-256, 1996.

WILLUMSEN, Pia A.; KARLSON, Ulrich. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1995.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- O *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 foi capaz de produzir um biossurfactante e um bioemulsificante com propriedades semelhantes aos surfactantes e emulsificantes quimicamente sintetizados;
- A produção do biossurfactante e bioemulsificante foram beneficiadas pelo uso óleo de soja pós-fritura, manipueira e milhocina, como estratégia biotecnológica e sustentável, favorecendo a redução dos custos de produção;
- O biossurfactante e o bioemulsificante produzido por *Syncephalastrum racemosum* possui estabilidade diante das variações térmica, iônica e do pH;
- O bioemulsificante possui importante propriedade na redução da viscosidade óleo queimado de motor, que indica sua possível aplicação em processos de biorremediação;
- Apresentam excelente capacidade molhante, sugerindo aplicabilidade para o processo de Recuperação Microbiana de Petróleo;
- Este bioprocessos se mostrou sustentável e suas finalidades foram cumpridas: a de valorização dos substratos agroindustriais e a produção de biossurfactante e bioemulsificante.