Avaliação do Desempenho e Análise de Custos da Produção de Biossurfatantes por *Bacillus subtilis*

Tatiane de Souza Profeta

Projeto de Final de Curso

Orientador

Profª. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Outubro de 2012

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E ANÁLISE DE CUSTOS DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTES POR *BACILLUS SUBTILIS*.

Tatiane de Souza Profeta

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

_____

Michelle Gonçalves Mothé, D.Sc.

_____

Silvia Maria Cruzeiro da Silva, D.Sc.

_____

Thiago Rocha dos Santos Mathias, M.Sc.

Orientado por:

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Outubro de 2012

Profeta, Tatiane de Souza.

Avaliação do Desempenho e Análise de Custos da Produção de Biossurfatantes por *Bacillus subtilis* / Tatiane de Souza Profeta. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2012.

viii, 61 p.; il. (Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011.

Orientadores: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.

1. Biossurfatante. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Avaliação Econômica. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5 Eliana Flávia Camporese Sérvulo. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivo e Marcia, por todo amor, compreensão, incentivo e dedicação.

À Profª Eliana Flávia, pela orientação e paciência, além dos valiosos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de concretizar este trabalho.

Ao Profº Antõnio Jorge Ribeiro pelo apoio e disponibilização do seu laboratório para a realização das análises cromatográficas.

À Profª Sílvia, por possibilitar a realização das análises de tensão superficial.

Aos integrantes do laboratório 107, pelo auxílio, companheirismo e pelo agradável ambiente de trabalho que proporcionaram durante esses dois anos de iniciação científica.

À Profª Maria Alice e demais integrantes do laboratório 103 que gentilmente ajudaram na liofilização das amostras de biossurfatantes.

Aos amigos de graduação, em especial Shalimar, Bernardo, Suzana, Rafael, Sara, Felipe e Lais pela amizade e apoio durante os últimos cinco anos.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E ANÁLISE DE CUSTOS DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTES POR *BACILLUS SUBTILIS*

Tatiane de Souza Profeta

Outubro, 2012

Orientador: Prof[a]. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Os biossurfatantes são compostos anfifílicos produzidos por micro-organismos, quando cultivados em diferentes fontes de carbono. Apresentam elevada atividade tensoativa, podendo ser aplicados em diversos setores industriais como uma alternativa aos surfatantes derivados do petróleo. Entretanto, os elevados custos de produção desestimulam o emprego desses compostos. O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas, sendo a primeira experimental e a segunda computacional. Na etapa experimental objetivou-se produzir o biossurfatante lipopeptídeo por *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima de baixo custo (açúcar cristal) e rejeito industrial (Levedura Residual Cervejeira, LRC) e avaliar o comportamento do biossurfatante produzido, quanto à atividade tensoativa, em diferentes relações de temperatura e pH, de modo a definir a sua aplicação em condições drásticas. O menor valor de tensão superficial obtido foi de 26,70 ± 0,21 mN/m, após 48 h de fermentação em meio contendo 10 g/L de açúcar cristal e 7,5 g/L de LRC. O biossurfatante produzido se manteve estável em diversas condições de temperatura e pH. A finalidade da segunda etapa deste trabalho foi aferir a rentabilidade do processo de obtenção do biossurfatante em escala comercial. Para isso, foi utilizado o *software SuperPro Design* (versão 6.0) como ferramenta computacional. O investimento necessário para montagem da unidade industrial foi estimado em R$ 41.914.993 e o custo de operação em R$ 11.439.989. Os indicadores econômicos calculados, como a taxa interna de retorno (25,55%), o valor presente líquido (R$ 31.106.877) e o tempo de retorno do investimento (3,37 anos) sugerem que o processo de produção adotado é economicamente viável.

ÍNDICE

Capítulo I – Introdução 1
Capítulo II – Objetivo Geral 3
II.1 – Objetivos Específicos 3
Capítulo III – Revisão Bibliográfica 4
III.1 – Surfatantes 4
III.1.1 – Classificação dos Surfatantes 6
III.2 – Propriedades Superficiais ou Interfaciais 8
III.2.1 – Propriedades e Aplicações dos Surfatantes 10
III.3 – Biossurfatantes 15
III.3.1 – Classificação e Origem Microbiana dos Biossurfatantes 17
III.3.2 – Aplicações Industriais dos Biossurfatantes 22
III.4 – Produção de Biossurfatantes por *Bacillus subtilis* 26
III.4.1 – Fatores que Influenciam a Produção de Biossurfatante por *Bacillus subtilis* . 29
III.4.2 – Métodos de recuperação da Surfactina 31
III.5 - Avaliação Econômica 33
III.5.1 – Custos e Investimentos 33
III.5.2 – Indicadores Econômicos 35
III.5.3 – Software SuperPro Design 36
Capítulo IV – Formulação de Meios de Baixo Custo para a Produção do Biossurfatante ... 37
IV.1 – Materiais e Métodos 37
IV.1.1 – Micro-organismo 37
IV.1.2 – Meios de Cultura 37
IV.1.3 – Descrição da Etapa Experimental 38
IV.1.4 – Métodos Analíticos 40
IV.2 – Resultados e Discussão 40
Capítulo V – Avaliação da Estabilidade do Biossurfatante Produzido 43
V.1 – Materiais e Métodos 43
V.1.1 – Produção/Recuperação do Biossurfatante 43
V.1.2 – Ensaio de Estabilidade 44
V.1.3 – Métodos Analíticos 45
V.2 – Resultados e Discussão 45

Capítulo VI – Simulação do Processo Industrial de Produção de Biossurfatante 48
VI.1 – Dados da Simulação 48
VI.1.1 – Operações e Equipamentos 48
VI.1.2 – Parâmetros de Dimensionamento dos Equipamentos 49
VI.1.3 – Parâmetros de Operação 49
VI.1.4 – Balanços de Massa e Energia 51
VI.2 – Avaliação Econômica 53
VI.2.1 – Custos dos Materiais 54
VI.2.2 – Custos da Mão-de-obra 55
VI.2.3 – Custos Fixos 56
VI.3 – Resultados da Simulação 56
VI.3.1 – Fluxograma 56
VI.3.2 – Balanço de Massa do Processo 58
VI.3.3 – Dimensionamento 59
VI.3.4 – Diagrama de Gantt 60
VI.4– Resultados da Avaliação Econômica 61
VI.4.1 – Custos de Investimento 61
VI.4.2 – Custos de Operação 62
VI.4.3 – Custo de Produção 64
VI.4.4 – Preço de Venda 65
VI.4.5 – Indicadores Econômicos 66
Capítulo VII – Conclusões 68
Capítulo VIII - Referências Bibliográficas 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1. Representação da estrutura anfifílica de um surfatante. 4

Figura III.2. Distribuição do surfatante na interface entre duas fases imiscíveis. 5

Figura III.3. Principais representantes das classes de surfatantes 6

Figura III.4. Representação das forças que atuam sobre duas moléculas posicionadas no interior e na superfície do líquido. 9

Figura III.5. Principais propriedades e áreas de aplicação dos surfatantes..... 10

Figura III.6. Representação de uma micela em ambiente aquoso. 12

Figura III.7. Esquema do comportamento de um tensoativo entre fluidos (ar/água) em função da tensão superficial, indicando a CMC 12

Figura III.8. Representação de diferentes formas de emulsão 13

Figura III.9. Aspectos físicos de um sistema com espuma 14

Figura III.10. Formação de um filme de espuma em uma solução com surfatante 14

Figura III.11. Estrutura de alguns glicolipídeos 19

Figura III.12. Estrutura química dos biossurfatantes do tipo lipopeptídeos. 21

Figura III.13. Estrutura do emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* 22

Figura III.14. Estrutura tridimensional da porção peptídica da surfactina. 27

Figura III.15. Despesas envolvidas no custo total de produção de uma planta química 34

Figura IV.1. Representação do processo de preparo do inoculo. 38

Figura IV.2. Esquema dos procedimentos utilizados para produção do biossurfatante.39

Figura IV.3. Aspecto do caldo fermentado com detalhe da formação de espuma ao término do processo fermentativo. 42

Figura IV.4. Aspecto da espuma após (a) 60 e (b) 120 minutos do fim da fermentação. 42

Figura V.1. Representação do processo de recuperação do biossurfatante do caldo fermentado. 43

Figura V.2. Precipitado obtido após acidificação do meio..... 44

Figura V.3. Condições adotadas para o ensaio de estabilidade. 44

Figura VI.1. Fluxograma da planta de produção de surfactina. 57

Figura VI.2. Diagrama de Gantt correspondente a uma batelada do processo de produção de surfactina. 60

Figura VI.3. Distribuição dos custos de operação. 64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III.1. Grupos hidrofílicos disponíveis comercialmente 5

Tabela III.2. Consumo de surfatantes nas áreas mais industrializadas em 2000 7

Tabela III.3. Valores típicos de tensões superficiais e interfaciais de líquidos a 20°C .. 9

Tabela III.4. Principais classes de biossurfatantes e seus micro-organismos produtores .. 18

Tabela III.5. Métodos de recuperação de biossurfatantes e suas vantagens 32

Tabela III.6. Critérios de rentabilidade 35

Tabela IV.1. Meios de produção: Formulações testadas 40

Tabela IV.2. Valores de tensão superficial determinados após fermentação nas diferentes formulações testadas 41

Tabela V.1. Produtividade da surfactina em diferentes meios de produção. 46

Tabela V.2. Efeito de diferentes condições de temperatura e pH sobre a estabilidade da atividade tensoativa do biossurfatante produzido. 47

Tabela VI.1. Operações unitárias e equipamentos empregados durante o processo 48

Tabela VI.2. Parâmetros de dimensionamento dos equipamentos do processo 49

Tabela VI.3. Tipos e duração das operações realizadas na produção do biossurfatante 50

Tabela VI.4. Parâmetros necessários ao cálculo dos indicadores econômicos do projeto .. 54

Tabela VI.5. Preço dos insumos consumidos na obtenção da surfactina 55

Tabela VI.6. Fatores adotados para a estimativa dos custos fixos do processo 56

Tabela VI.7. Vazão mássica das correntes da etapa de preparo do inóculo (1 a 3) 58

Tabela VI.8. Vazão mássica das correntes da etapa de fermentação (4 a 10) 58

Tabela VI.9. Vazão mássica das correntes da etapa de recuperação primária (11 a 15) 59

Tabela VI.10. Capacidade e material dos equipamentos do processo 59

Tabela VI.11. Parâmetros globais da simulação 61

Tabela VI.12. Custo dos equipamentos 61

Tabela VI.13. Custos Diretos e Indiretos 62

Tabela VI.14. Custos de Trabalho (com impostos) 62

Tabela VI.15. Custos de Matéria-prima 63

Tabela VI.16. Custo de Utilidades 63

Tabela VI.17. Custo anual de operação 63

Tabela VI.18. Preços de venda para biossurfatantes do tipo ramnolipídeos 65

Tabela VI.19. Fluxo de caixa (milhões de reais) 66

Tabela VI.20. Indicadores de rentabilidade para o processo de produção de surfactina 67

Capítulo I – Introdução

O termo surfatante é uma contração da expressão da língua inglesa ***Sur**face **Act**ive Age**nts*** (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Esses compostos são caracterizados pela estrutura anfifílica, o que lhes confere a capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais entre fluidos de polaridades opostas. Por isso, também são chamados de agentes tensoativos.

Os biossurfatantes são substâncias de origem biológica, produtos do metabolismo de micro-organismos, vegetais e animais, que apresentam atividade tensoativa. O papel fisiológico que desempenham ainda não é totalmente conhecido. Contudo, a sua produção está associada à necessidade de aumentar a disponibilidade de substratos insolúveis em meio aquoso (DESAI; BANAT, 1997).

O crescente interesse nos biossurfatantes deve-se às propriedades que permitem a sua utilização e possível substituição dos surfatantes convencionais, tais como: seletividade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade a altas temperaturas, pH e salinidade, e condições amenas de síntese (RON; ROSENBERG, 2001). Tais atrativos despertam a atenção das indústrias alimentícia, farmacêutica, petroquímica, de cosméticos, de produtos para agricultura, entre outras. Porém, os maiores custos de produção dos biossurfatantes em comparação aos dos surfatantes derivados do petróleo normalmente comercializados, aliado a baixa produtividade dificultam a sua introdução no mercado.

As pesquisas na área de produção de biossurfatantes visam à redução dos custos, através do aumento do rendimento do produto, a utilização de matéria-prima barata e desenvolvimento de técnicas de recuperação e purificação mais eficientes. Por exemplo, o custo com matéria-prima pode representar de 10 a 30% do valor final do biossurfatante (DESAI; BANAT, 1997). Portanto, uma estratégia para reduzir os custos da produção seria o uso de matérias-primas baratas, particularmente os resíduos agroindustriais ou de indústrias alimentícias, que geralmente contêm altos níveis de carboidratos ou lipídeos necessários para a biossíntese de biossurfatantes (JOSHI *et al.*, 2008).

Neste cenário, a biodiversidade e a intensa atividade agroindustrial brasileira fornece biomassa abundante que pode ser aproveitada para formulação de meios de cultura a baixo custo. Portanto, escolher adequadamente a matéria-prima é um meio de

viabilizar economicamente a produção do biossurfatante, além de economizar recursos com tratamento e descarte de efluentes. Por isso, no presente trabalho foi estudada a produção do lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* a partir de açúcar cristal como principal fonte de carbono e energia e de biomassa residual cervejeira, um rejeito da indústria cervejeira, para atender as necessidades da bactéria do elemento nitrogênio.

No Brasil, o açúcar cristal, por ser uma fonte renovável abundante e de baixo custo, já vem sendo empregado há algumas décadas como matéria-prima para a produção comercial de ácido lático e ácido cítrico, ambos por via microbiana.

O nosso país também gera grande quantidade de biomassa de levedura nas indústrias cervejeiras e destilarias produtoras de bioetanol. Este material, rico em carboidratos, contém elevado teor em proteína (30% a 70%), apresentando ainda vitaminas do complexo B (B_1, B_2, B_6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), sais minerais, particularmente selênio, e fibra dietética, por isso sendo considerado um excelente complemento nutricional (HALASZ; LÁSZTITY, 1991). Na forma inativa, este micro-organismo tem sido muito usado como ração animal (BUTOLO, 1996). Também pode ser utilizado para alimentação humana, principalmente na forma de derivados, como complemento nutritivo, aromatizante e realçador de sabor (PEIXOTO, 1996; SGARBIERE *et al*. 1999).

Este trabalho ainda visa avaliar o investimento para a produção de biossurfatante por via microbiana a partir de matérias-primas de baixo custo na ótica de balizar e distinguir rentabilidade (retorno esperado), volatilidade/risco e liquidez. Estas características são essenciais quando se pretende dar início a um determinado processo a fim de garantir a sua exequibilidade técnica-financeira.

Capítulo II – Objetivo Geral

Este trabalho teve como metas principais avaliar a estabilidade da atividade tensoativa do biossurfatante, produzido por *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima de baixo custo e rejeito industrial, em diferentes valores de temperatura e pH, bem como estimar a viabilidade econômica do processo de obtenção deste biossurfatante em escala industrial.

II.1 – Objetivos Específicos

1. Formular um meio adequado à produção de biossurfatante por *Bacillus subtilis*, a partir de açúcar cristal e levedura residual de cervejaria, ambas matérias-primas de baixo custo;
2. Avaliar a tensão superficial do biossurfatante produzido após exposição a diferentes condições de temperatura e pH;
3. Simular a produção de biossurfatante em larga escala, usando o programa SuperPro Design 6.0;
4. Calcular os indicadores de rentabilidade do processo simulado.

Considerando a distinção dos objetivos específicos, cada um dos escopos será apresentado em um capítulo, que conterá a metodologia e os resultados obtidos. Pretende-se assim facilitar o entendimento das etapas realizadas.

Capítulo III – Revisão Bibliográfica

III.1 – Surfatantes

São compostos orgânicos que possuem estrutura anfifílica, ou seja, apresentam, na mesma molécula, grupos hidrofóbicos (apolares) e hidrofílicos (polares). O duplo caráter da estrutura confere aos surfatantes afinidade com diversas substâncias e versatilidade em aplicações industriais (ROSEN, 2004). A Figura III.1 representa uma molécula de surfatante.

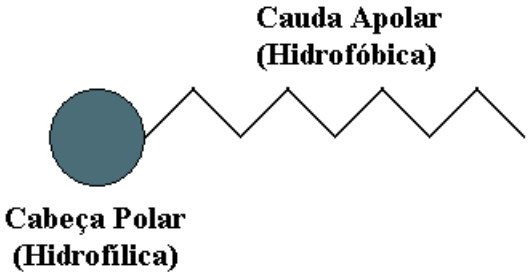


Figura III.1. Representação da estrutura anfifílica de um surfatante.

O grupo hidrofóbico consiste em uma cadeia de carbonos e é denominado de cauda. A parte hidrofílica, chamada de cabeça, é formada por um grupamento iônico ou polar, que determina a classificação e as características mais marcantes do surfatante. A Tabela III.1 apresenta os principais grupos hidrófilos encontrados comercialmente.

Tabela III.1. Grupos hidrofílicos disponíveis comercialmente

Nome do Grupo	Estrutura Dissociada
Sulfonato	$R - SO_3^- M^+$
Sulfato	$R - OSO_3^- M^+$
Carboxilato	$R - COO^- M^+$
Fosfato	$R - OPO_3^- M^+$
Amônio	$R - N^+ R'_x H_y X^-$ $(x = 1 - 3, y = 3 - 1)$
Amônio Quaternário	$R - N^+ R'_3 X^-$
Betaína	$R - N^+ (CH_3)_2 CH_2 COO^-$
Sulfobetaína	$R - N^+ (CH_3)_2 CH_2 CH_2 SO_3^-$
Polioxietileno	$R - OCH_2 CH_2 (OCH_2 CH_2)_n OH$
Polioxietileno Sulfato	$R - OCH_2 CH_2 (OCH_2 CH_2)_n OSO_3^- M^+$
Poliois	$R - OCH_2 - CH(OH) - CH_2 OH$
Ésteres de Sacarose	$R - O - C_6 H_7 O(OH)_3 - O - C_6 H_7 (OH)_4$
Ésteres Poliglicidílicos	$R{-}(OCH_2 CH[CH_2 OH] CH_2)_n - \cdots$ $- OCH_2 CH[CH_2 OH] CH_2 OH$

Fonte: Adaptado de MYERS (2006).

Os surfatantes atingem maior estabilidade quando a região hidrofílica está em contato com um solvente polar e a hidrofóbica, com um apolar. Esta configuração ocorre na fronteira entre dois compostos, onde os surfatantes se concentram (Figura III.2). A interação simultânea com as duas superfícies, através da formação de uma película ordenada de moléculas, é a responsável pela alteração das condições existentes nas interfaces, principalmente pela redução da energia e formação de microemulsões.

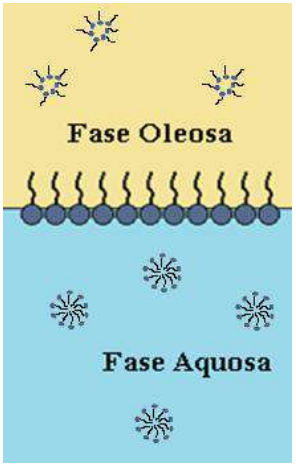


Figura III.2. Distribuição do surfatante na interface entre duas fases imiscíveis.

Atualmente, os surfatantes disponíveis comercialmente provêm de duas fontes principais: matéria-prima renovável (sementes oleaginosas, gordura animal e vegetal) e, particularmente, de derivados de petróleo. Dá-se preferência à síntese de estruturas lineares ou quase que completamente lineares para favorecer a biodegradação dos resíduos do surfatante (MYERS, 2006).

III.1.1 – Classificação dos Surfatantes

A classe a que pertence um surfatante é determinada de acordo com o comportamento da cabeça hidrófila em meio aquoso. A Figura II.3 mostra os representantes mais comuns de cada classe.

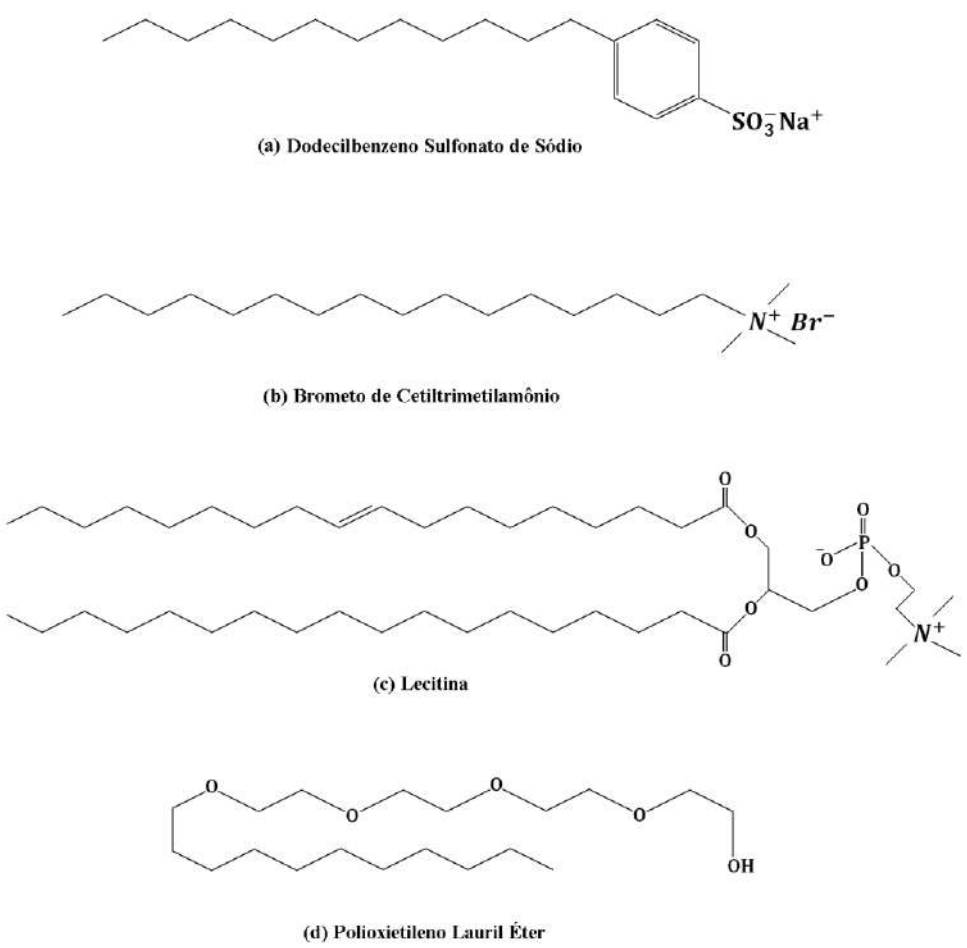


Figura III.3. Principais representantes das classes de surfatantes. [(a) aniônico; (b) catiônico; (c) anfótero; (d) não-iônico].

Aniônicos

Apresentam carga negativa quando dissociados em solução aquosa. Segundo Myers (2006) é o grupo mais consumido mundialmente (Tabela III.2), responsável por 70 a 75% do mercado.

Caracterizam-se principalmente pela variedade química uma vez que existe a possibilidade de inúmeras modificações dos grupos hidrofóbicos pela adição de uma espécie aniônica.

Tabela III.2. Consumo de surfatantes nas áreas mais industrializadas em 2000

Tipo do Surfatante	Consumo ($x\ 10^3$ toneladas)	Percentual (%)
Aniônicos (total)	4284	65
Não-iônicos (total)	1845	28
Outros (anfóteros, catiônicos, etc)	461	7
Total	6590	100

Fonte: MYERS (2006).

Catiônicos

Possuem grupamentos funcionais que, em solução aquosa, se dissociam, apresentando carga positiva.

São reconhecidamente capazes de inibir o desenvolvimento de micro-organismos. A propriedade antisséptica foi o principal motivo para sua adoção pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Atualmente, também são aplicados como impermeabilizantes e fixadores de cor na indústria têxtil, e como lubrificante e inibidor de corrosão (MYERS, 2006).

Anfóteros

Estas substâncias podem adquirir carga positiva, negativa ou neutra dependendo das condições ambientais a que forem expostas. São empregados em produtos que necessitem ter boa biocompatibilidade ou onde haja a presença de espécies carregadas.

Como pode ser confirmado na Tabela III.2, este grupo representa uma pequena parcela do mercado, embora, a perspectiva de crescimento seja boa.

Não-iônicos

Apresentam grupos polares que não ionizam em solução, como álcoois, fenóis, amidas ou ésteres. A ausência de carga torna-os menos sensíveis a concentração de sais e as alterações de pH.

A natureza da molécula determina de que maneira o surfatante interage com as superfícies, sendo um critério importante para a escolha de sua aplicação industrial. As diferenças entre os grupos hidrofóbicos são pouco notáveis e interferem pouco no desempenho dos surfatantes.

III.2 – Propriedades Superficiais ou Interfaciais

As interações físicas entre as moléculas no seio de um líquido apresentam resultante nula devido à simetria das forças intermoleculares, que atuam em todas as direções. Entretanto, na interface ou na superfície livre de um líquido, essas moléculas sofrem apenas atração lateralmente e na parte inferior, conforme ilustra a Figura III.4.

Importante salientar que na superfície, cada molécula está sujeita a pouca interação o que permite que se ligue com maior intensidade às moléculas vizinhas. Este fenômeno gera propriedades elétricas, químicas e físicas características na região superficial ou interfacial que são significativamente diferentes daquelas encontradas no seio do líquido (ROSEN, 2004).

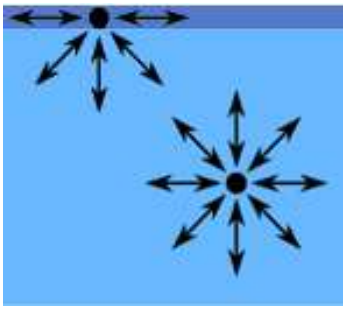


Figura III.4. Representação das forças que atuam sobre duas moléculas posicionadas no interior e na superfície do líquido.

A tensão superficial ou interfacial é a medida da resistência oferecida na superfície livre de um líquido ou na interface entre líquidos imiscíveis, respectivamente, como resultado das forças coesivas entre as moléculas que ocupam esta região.

Um tensoativo pode ser considerado eficiente quando é capaz de reduzir a tensão interfacial entre a água e o ar, em média 72, para 35 mN/m, e a tensão interfacial entre a água e o n-hexadecano de 40 para 1 mN/m (SOBERON-CHÁVEZ, 2011). A Tabela III.3 mostra os valores típicos para as tensões superficiais e interfaciais de alguns líquidos a 20°C.

Tabela III.3. Valores típicos de tensões superficiais e interfaciais de líquidos a 20°C

Líquido	Tensão Superficial (mN/m)	Tensão Interfacial (vs. Água, mN/m)
Água	72,8	-
n-Octano	21,8	50,8
Benzeno	28,9	35,0
n-Octanol	27,5	8,5
Mercúrio	485	375

Fonte: MYERS (2006).

O estudo das propriedades interfaciais, como a tensão superficial, é fundamental para a compreensão do comportamento de emulsões, dispersões, da flotação, corrosão e de outros eventos que interessam as indústrias químicas.

III.2.1 – Propriedades e Aplicações dos Surfatantes

Um surfatante é caracterizado pelas propriedades físico-químicas que permitem aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meio aquoso, formar emulsões, e reduzir a tensão superficial (DESAI; BANAT, 1997). Essas propriedades, expressas através da solubilidade, formação de micelas, poder de detergência, umectância e capacidade espumante propiciam diferentes aplicações industriais.

Dentre as aplicações mencionadas na literatura, o emprego dos surfatantes é primordial nas indústrias farmacêutica, cosmética, têxtil, de alimentos, de petróleo, e em processos de mineração. A Figura III.5 ilustra as principais áreas de atuação desses compostos tensoativos e as propriedades associadas a essas aplicações, as quais serão descritas a seguir.

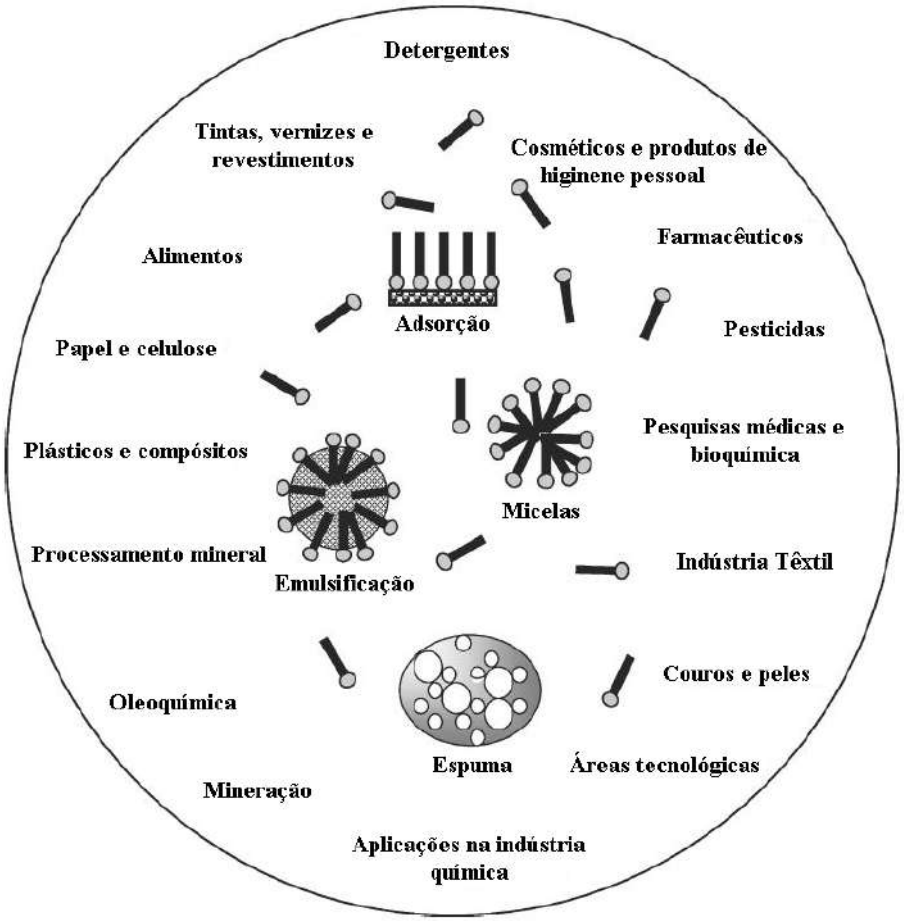


Figura III.5. Principais propriedades e áreas de aplicação dos surfatantes (MYERS, 2006).

Adsorção

É o processo de transferência das moléculas do surfatante do interior do líquido para a superfície de sólidos. O comportamento na superfície é determinado por forças como, atrações eletrostáticas, ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e solvatação de várias espécies (PARIA; KHILAR, 2004). Por exemplo, a adsorção dos surfatantes a superfícies sólidas pode modificar sua hidrofobicidade, carga superficial e outras propriedades que governam os processos interfaciais tais como floculação, dispersão, flotação, molhamento, detergência, recuperação de óleo, e inibição da corrosão (ZHANG; SOMASUNDARAN, 2006).

O estudo da adsorção permite determinar a concentração do surfatante, a orientação e a distribuição do surfatante na superfície de materiais (MYERS, 2006).

Formação de Micelas

A formação de micelas é o fenômeno responsável por algumas das principais características dos surfatantes, como a detergência e a solubilização.

Em fluidos, existe a tendência das moléculas do surfatante de se aglomerarem na superfície de líquidos ou na interface entre líquidos imiscíveis, de modo que o grupo polar esteja localizado na fase aquosa, enquanto o apolar se direciona para a fase não aquosa adjacente (WENNERSTRÖM; LINDMAN, 1979). A partir do momento que a superfície ou a interface esteja totalmente recoberta por moléculas de surfatante, as demais moléculas passam a se dispor na forma de agregados, geralmente globulares, que recebem a denominação de micelas. A Figura III.6 ilustra uma micela em ambiente aquoso, onde as porções hidrofóbicas se agrupam, expondo as porções hidrofílicas ao meio.

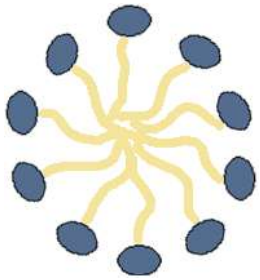


Figura III.6. Representação de uma micela em ambiente aquoso.

A concentração a partir da qual se inicia a formação das micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC). A Figura III.7 representa o comportamento de um surfatante em solução aquosa, destacando o ponto de determinação da CMC.

Quanto maior o valor de CMC, maior a quantidade de surfatante (SANTOS *et al.*, 2007). Logo, a determinação da CMC é um modo indireto de determinar a concentração de surfatante em um determinado produto.

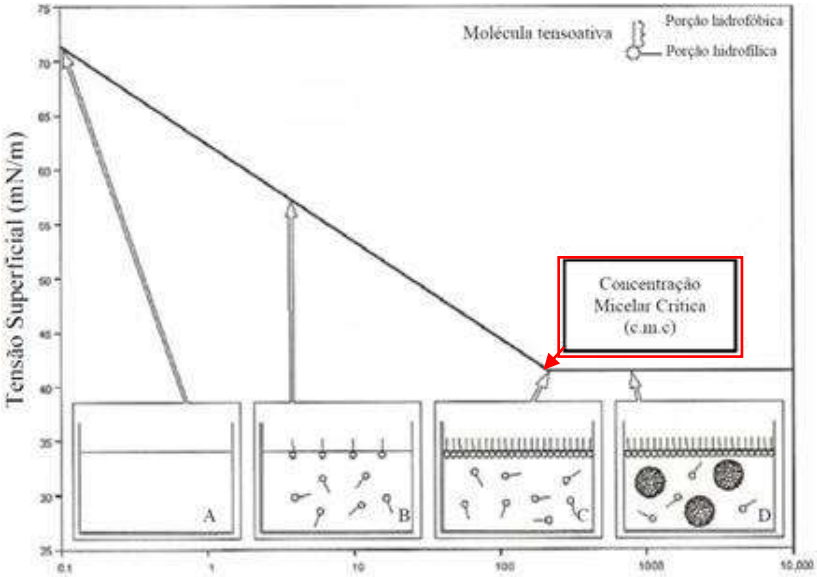


Figura III.7. Esquema do comportamento de um tensoativo entre fluidos (ar/água) em função da tensão superficial, indicando a CMC [A: tensão superficial da água; B: baixa concentração de surfatante; C: saturação da superfície; D: superfície completamente preenchida, sem alterações na tensão superficial] (Adaptado de SANTOS *et al.*, 2007).

Emulsificação

A formação de emulsão entre duas fases líquidas imiscíveis é a mais versátil propriedade dos tensoativos e, por isso, é extensivamente estudada. Tintas, pesticidas, sorvetes, margarina, maionese, molhos, cosméticos, limpadores de metais, óleos têxteis são exemplos de formas de emulsão.

Uma emulsão é uma dispersão coloidal, formada pela mistura relativamente estável de dois líquidos imiscíveis, o que permite a formação de gotículas de um dos fluidos no seio do outro. A Figura III.8 ilustra diferentes tipos de emulsão e a formação de uma emulsão estável pela presença de um composto surfatante.

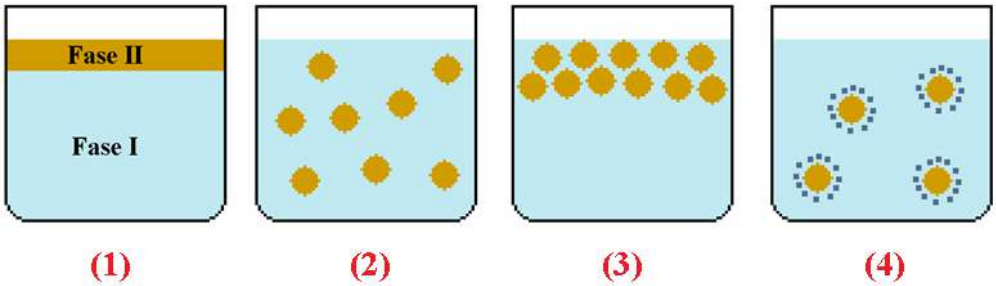


Figura III.8. Representação de diferentes formas de emulsão [(1) Duas fases imiscíveis; (2) Dispersão da fase II na fase I; (3) Tendência das gotículas dispersas a retornarem a condição inicial; (4) Surfatante (pontos azuis) estabilizando a emulsão ao se concentrarem na interface entre as fases].

Os surfatantes desempenham um papel fundamental na formação de emulsões, ao reduzirem a energia necessária para romper uma gotícula e prevenir a coalescência das novas gotas formadas (MYERS, 2006). Destaca-se também a capacidade dos surfatantes de aumentar a elasticidade superficial e, no caso dos surfatantes iônicos, a repulsão entre as moléculas. Estes fatores contribuem para a estabilidade das emulsões.

Atividade Espumante

A formação de espuma pode ser obtida pela insuflação de um gás abaixo da superfície de um líquido. Logo, conforme ilustrado na Figura III.9, a espuma é uma dispersão coloidal na qual o gás se encontra disperso em uma fase liquida contínua (ROSEN, 2004).

A espuma pode conter além de gás, líquido e surfatantes, partículas sólidas ou de óleo dispersas. Como exemplos: (i) uma solução detergente usada em um processo de limpeza; e (ii) espuma que se forma em um reservatório de óleo e se propaga durante o processo de recuperação (SCHRAMM, 2005).

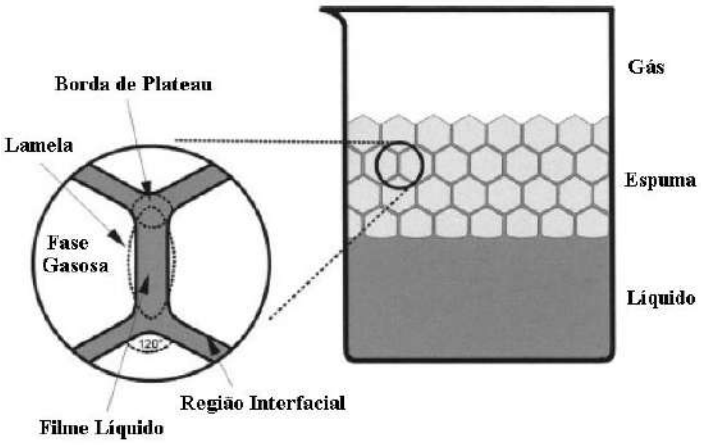


Figura III.9. Aspectos físicos de um sistema com espuma (Adaptado de ROSEN, 2004).

Em uma solução contendo surfatante, uma bolha, ao alcançar a superfície, forma um filme semiesférico composto de duas lâminas de surfatante com uma porção líquida entre elas (Figura III.10). A presença do tensoativo assegura a estabilidade do filme líquido, e o mantém estável por um extenso período de tempo.

.

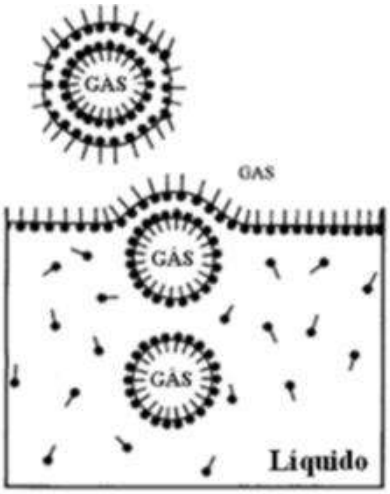


Figura III.10. Formação de um filme de espuma em uma solução com surfatante (EXEROWA; KRUGLYAKOV, 1997).

Sistemas com espuma são comuns em alimentos, cremes de barbear, espuma de combate a incêndios, detergentes e flotação mineral (SCHRAMM, 2005). Como a concentração de bolhas afeta diretamente as propriedades espumantes; a produção, a dispersão e a estabilidade das bolhas são cruciais para essas aplicações.

III.3 – Biossurfatantes

Os biossurfatantes são compostos tensoativos sintetizados por plantas, animais e micro-organismos. Podem ser divididos entre aqueles que possuem baixa massa molar, que se caracterizam pela capacidade de diminuir as tensões superficiais e interfaciais, e os polímeros de elevada massa molar**,** que aderem firmemente as interfaces (RON; ROSENBERG, 2001).

Similarmente aos surfatantes de origem sintética, os biossurfatantes são anfifílicos, mas apresentam várias estruturas moleculares. A porção hidrofílica é formada por aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions, mono-, di- ou polissacarídeos, enquanto a porção hidrofóbica consiste de ácidos graxos saturados ou insaturados (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Estas biomoléculas apresentam várias vantagens em relação ao surfatantes sintéticos, tais como (DESAI; BANAT, 1997; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; PORNSUNTHORNTAWEE *et al.*, 2007; SOBERON-CHÁVEZ, 2011):

1. Melhores propriedades físico-químicas: a atividade tensoativa dos biossurfatante é comparável a dos surfatantes sintéticos. Pornsunthorntawee *et al.* (2007) demonstraram que um biossurfatante do tipo ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72,0 mN/m a 29,0 mN/m com uma C.M.C. de 200 mg/L, enquanto os surfatantes Pluronic F-68 e dodecil sulfato de sódio diminuíram a tensão a 42,8 e 28,6 mN/m nos valores de C.M.C. de 350 e 1280 mg/L, respectivamente.

2. Maior solubilidade: os biossurfatantes possuem cadeias alquílicas curtas, o que propicia elevada solubilidade em água.

3. Biodegradabilidade: os biossurfatantes possuem cadeias alquílicas curtas que aumentam a solubilidade aquosa desses compostos. Hirata *et al.* (2009)

avaliaram a biodegradabilidade de um soforolipídeo produzido por *Candida bambicola*, e compararam a quatro surfatantes, incluindo dois copolímeros em bloco aniônicos, lauril sulfato de sódio e dodecil sulfato de sódio. Os autores determinaram elevado percentual de degradação (aproximadamente 61%) dos biossurfatantes em apenas oito dias, enquanto a concentração dos surfatantes sintéticos permanecia inalterada.

4. Baixa toxicidade: comparados aos surfatantes sintéticos, os biossurfatantes são eficazes a concentrações mais baixas, e devido à biodegradabilidade, não acumulam no meio ambiente, representando, portanto, um risco menor a saúde humana e animal.

5. Biocompatibilidade: a origem biológica dos biossurfantes permite sua aplicação em alimentos, produtos cosméticos e fármacos (resultando em menos efeitos tóxicos) sem provocar os efeitos alérgicos dos produtos artificiais.

6. Eficiência em ampla faixa de temperatura, pH, e salinidade: alguns biossurfatantes preservam a atividade tensoativa sob valores elevados de temperatura, pressão e concentração de NaCl, condições normalmente associadas aos reservatórios de petróleo, onde os biossurfatantes podem ser empregados para aumentar a recuperação de óleo.

7. Condições amenas de síntese: as operações envolvidas na produção microbiológica de biossurfatantes são conduzidas, geralmente, em valores de pH neutro, temperatura ambiente e pressão atmosférica, condição que torna o processo mais seguro e diminui os gastos com energia.

8. Produção a partir de matéria-prima renovável: a fonte de carbono para produção de biossurfatantes pode ser carboidratos ou lipídeos, os quais podem ser obtidos de matérias-primas residuais, de fácil acesso e disponíveis em grandes quantidades. A diversidade de matérias-primas também favorece a síntese de biossurfatantes com estruturas diversificadas que podem ser direcionados para aplicações específicas.

9. Diversidade estrutural e química: a estrutura química do biossurfatante se diferencia de acordo com o micro-organismo produtor. Além disso, para uma mesma cepa microbiana, pode haver variação química e estrutural da biomolécula dependendo das condições de cultivo, nutricional e ambiental. Diversos grupos funcionais podem ser sintetizados, conferindo estruturas químicas diferenciadas e, por conseguinte, propriedades únicas aos biossurfatantes. Tem-se ainda que a síntese dos grupos funcionais pode ser manipulada por engenharia genética, de modo que os biossurfatantes podem se adequar a aplicações mais específicas que os surfatantes quimicamente sintetizados.

Apesar das várias vantagens dos biossurfatantes, algumas das quais acima descritas, a sua produção comercial é comprometida pelos custos elevados. Para superar este obstáculo, uma possível estratégia é a utilização de matéria-prima de baixo custo ou, ainda melhor, um rejeito da agroindústria.

III.3.1 – Classificação e Origem Microbiana dos Biossurfatantes

Os biossurfatantes são caracterizados principalmente de acordo com a estrutura química, diferentemente dos surfatantes sintéticos que são classificados conforme a natureza do seu grupo hidrofílico.

A Tabela III.4 lista as principais classes de biossurfatantes e seus respectivos produtores (DESAI; BANAT, 1997), alguns dos quais serão descritos a seguir.

Tabela III.4. Principais classes de biossurfatantes e respectivos micro-organismos produtores

Tipo de Biossurfatante	Micro-organismo
Glicolipídeos	
– Ramnolipídeos	*Pseudomonas aeruginosa*
– Soforolipídeos	*Torulopsis babiciola, T.apicola*
– Trealolipideos	*Rhodococcus erythropolis*
– Celobiolipideos	*Mycobacterium* sp.
	Ustilago zeae, Ustilago maydis
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
– Peptídeo-lipídeo	*Bacillus licheniformis*
– Viscosina	*Pseudomonas fluorescens*
– Serrawetina	*Serratia marcescens*
– Surfactina	*Bacillus subtilis*
– Subtilisina	*Bacillus subtilis*
– Gramicidina	*Bacillus brevis*
– Polimixina	*Bacillus polymyxa*
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
– Ácidos graxos	*Corynebacterium lepus*
– Lipídeos neutros	*Nocardia erythropolis*
– Fosfolipídeos	*Acidthiobacillus thiooxidans*
Surfatantes poliméricos	
– Emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
– Biodispersan	*Acinetobacter calcoaceticus*
– Liposan	*Candida lipolytica*
– Carboidrato-lipídeo-proteína	*Pseudomonas fluorescens*
– Manana-lipídeo-proteína	*Candida tropicallis*
Surfacantes particulados	
– Vesículas	*Acinetobacter calcoaceticus*
– Células	Várias bactérias

Fonte: NITSCHKE e PASTORE (2002).

Glicolipídeos

De acordo com Soberon-Chávez (2011), os glicolipídeos são os surfatantes microbianos mais conhecidos e estudados, inclusive, sendo alguns produzidos comercialmente. Estes biossurfatantes, formados por um ou mais carboidratos associados a ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos graxos hidroxilados, normalmente estão envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por micro-organismos.

Uma determinada espécie microbiana é capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídeos, dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento (ZAJIC; SEFFENS, 1984).

A Figura III.11 apresenta a estrutura química dos glicolipídeos mais conhecidos.

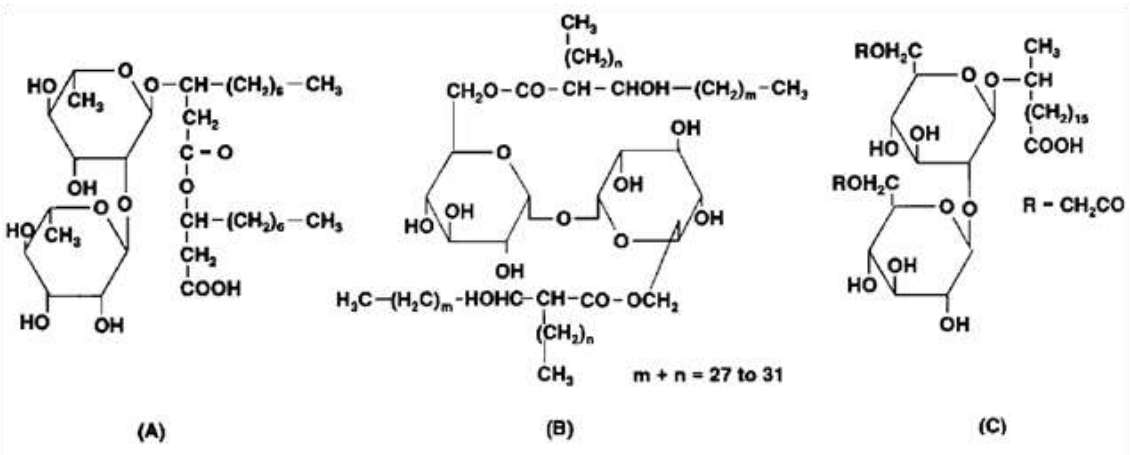


Figura III.11. Estrutura de alguns glicolipídeos [(A) Ramnolipídeo tipo 1 produzido por *Pseudomonas aeruginosa*; (B) Trealolipídeo de *Rhdococcus erythropolis*; (C) Soforolipídeo de *Torulopsis bombicola*] (DESAI; BANAT, 1997).

1. Ramnolipídeos

Dentre os glicolipídeos mais conhecidos e mais estudados têm-se os ramnolipídeos. Estes são constituídos por uma ou duas unidades de ramnose ligada(s) a uma ou duas moléculas de ácido β – hidroxi decanóico (DESAI; BANAT, 1997).

Várias espécies do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir grandes quantidades destes compostos (PARRA *et al*., 1989). Entre os principais ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa,* estão L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato (tipo 1) e L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato (tipo 2).

2. Trealolipídeos

Os trealolipídeos são principalmente produzidos por actinomicetos (ZAJIC; SEFFENS, 1984). Conforme citado por Desai e Banat (1997), os trealoselipídeos se encontram interligados na parede celular, de onde podem ser facilmente extraídos com n-hexano.

São compostos de trealose e de duas moléculas de ácido micólico (ácido β-hidroxicarboxílico de cadeia longa e ramificada), que diferem em tamanho, estrutura, número de carbonos e grau de insaturações. O grau de instauração da molécula depende do micro-organismo produtor, enquanto a composição e o número de esterificação do ácido micólico são influenciados pelas condições de cultivo (DESAI; BANAT, 1997).

3. Soforolipídeos

Estes são produzidos por leveduras, principalmente as espécies do gênero *Torulopsis* (DESAI; BANAT, 1997). As células de *Torulopsis* sp. excretam uma mistura de 6 a 9 diferentes tipos de soforolipídeos de caráter altamente hidrofóbico.

A molécula é formada pelo dissacarídeo soforose acetilado e ligado a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado (DUARTE, 2003). Devido à biodegradabilidade e ausencia de toxicidade, estes biossurfatantes têm tido potencial uso em formulações de produtos de lavagem e de limpeza (FLEURACKERS, 2006).

Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são formados por peptídeos, normalmente cíclicos, ligados a ácidos graxos. Os mais estudados são os produzidos pelo gênero bacteriano *Bacillus*, subdividindo-se em iturina, fengicina e surfactina (Figura III.12), que se destacam pelo poder antimicrobiano e notável atividade tensoativa (LANG, 2002).

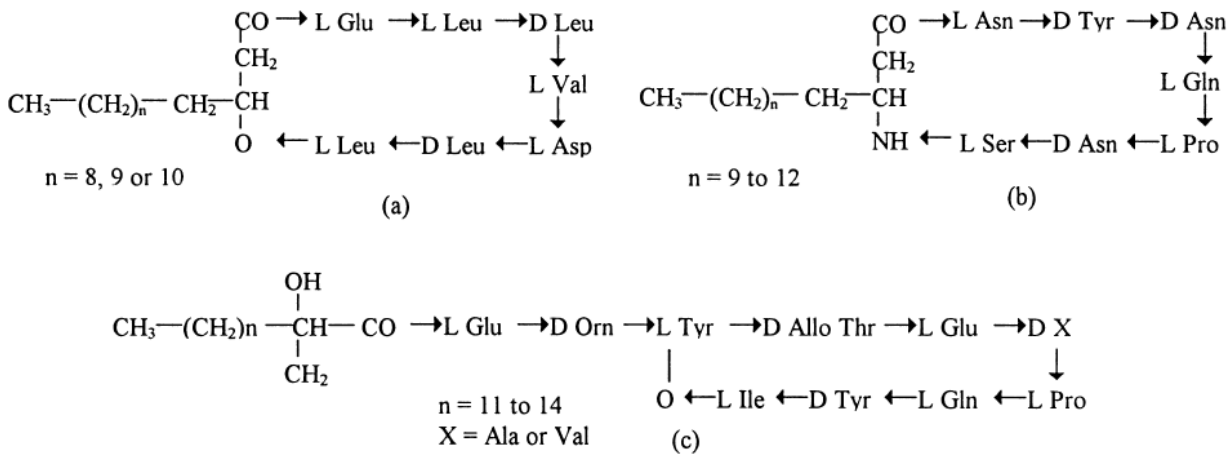


Figura III.12. Estrutura química dos biossurfatantes do tipo lipopeptídeos. [(a) Estrutura da surfactina, (b) estrutura da iturina, (c) estrutura da fengicinas] (DELEU *et al.*, 1999).

Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos

Estes biossurfatantes são compostos por uma molécula de glicerol ligada a duas de ácido graxo e a um grupamento fosfato (VALPUESTO, 2008). A produção de ácidos graxos e fosfolipídeos anfifílicos tem sido observada durante o crescimento de bactérias e leveduras em meios ricos em alcanos.

Biossurfatantes poliméricos

A produção de biossurfatantes extracelulares de alta massa molar, denominados poliméricos, é predominante no gênero *Acinetobacter* (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999). Os representantes mais conhecidos são o emulsan, liposan, manoproteina e alguns complexos de polissacarídeos-proteínas, como o alasan produzido por *Acinetocbacter radioresistens* (LANG, 2002).

O emulsan (Figura III.13) é um bioemulsificante aniônico composto por um heteropolissacarídeo anfipático produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ROSEMBERG *et al.*, 1979 *apud* DESAI; BANAT, 1997).

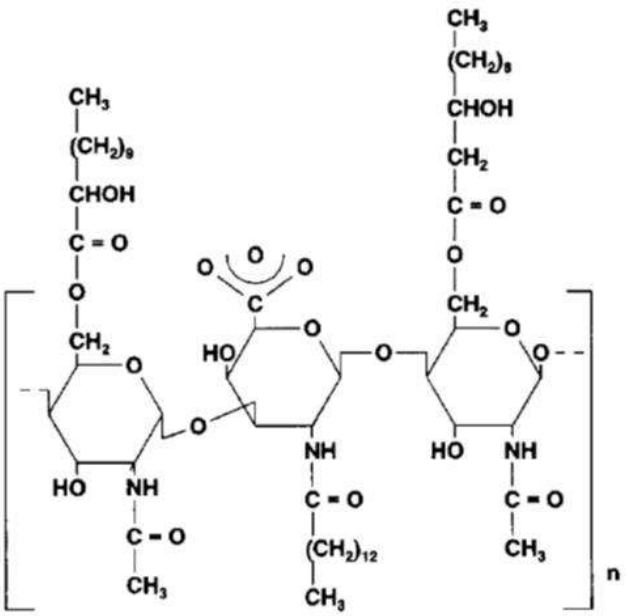


Figura III.13. Estrutura do emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* **(**DESAI; BANAT, 1997).

Há autores que classificam vesículas extracelulares como agentes tensoativos particulados por formarem microemulsões e permitirem a assimilação de substâncias pouco solúveis (DESAI; BANAT, 1997).

III.3.2 – Aplicações Industriais dos Biossurfatantes

Além da ação tensoativa, os biossurfatantes se destacam por apresentar propriedades terapêuticas e biomédicas importantes, tais como: atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral; ação antiaderente contra agentes patogênicos, entre outras (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; SINGH; CAMEOTRA, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Devido às características dos biossurfatantes, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e diversidade funcional, algumas das principais aplicações estão relacionadas à área ambiental, como a biorremediação de locais contaminados por óleo ou metais pesados. Segundo Nitschke e Pastore (2002), o maior consumo de biossurfatantes ocorre na indústria petrolífera, onde eles são utilizados na recuperação avançada de petróleo (MEOR), em formulações de óleos lubrificantes e na remoção de

resíduos de óleo em tanques de estocagem e dutos. Entretanto, são possíveis aplicações nos vários segmentos industriais.

Indústria do petróleo

Os surfatantes sintéticos são usados pela indústria petrolífera na remediação de áreas contaminadas por derramamentos de óleo e na recuperação do óleo aprisionado no interior dos reservatórios. Estes compostos são geralmente tóxicos e de difícil degradação, o que gera riscos e impactos ambientais associados a sua utilização. No entanto, é possível aplicar os surfatantes microbianos que possuem propriedades físico-químicas equivalentes e são biodegradáveis.

Assim, aumenta a disposição para o uso dos biossurfatantes nas áreas de gestão de vazamentos de óleo; controle de poluição; limpeza de instalações de armazenamento e dutos de petróleo; e na recuperação avançada de petróleo ou MEOR (BANAT, 1995).

O óleo e a lama que se depositam no fundo dos tanques de armazenagem são retirados através do processo de bombeamento. Porém, as frações mais pesadas, devido a sua elevada viscosidade, se acumulam no fundo, sendo apenas possível a limpeza pelo uso de solvente ou por métodos que envolvem riscos e altos custos. Uma alternativa é o emprego de surfatantes para a formação de emulsão óleo/água, o que possibilita o seu posterior bombeamento. A partir da década de 70, os surfatantes biológicos têm sido utilizados com este propósito (BUENO, 2008).

A MEOR é uma técnica de recuperação de petróleo que emprega micro-organismos ou seus metabólitos para estimular o desprendimento do óleo preso nos capilares da rocha reservatório. Os micro-organismos produzem substâncias tensoativas (biossurfatantes) que reduzem a tensão superficial entre o óleo e a rocha, favorecendo a mobilidade do óleo através dos poros da rocha (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Biorremediação

A atual consciência ambiental tem motivado a busca por novas tecnologias que permitam a limpeza dos ambientes por meio de métodos eficientes e seguros. A diversidade estrutural e as propriedades físico-químicas dos biossurfatantes tornam estes

compostos uma opção interessante e ecologicamente segura para a remediação de locais impactados.

Os biossurfatantes podem ser utilizados diretamente nos locais poluídos, ou ter a sua produção estimulada *in situ* através da inserção de micro-organismos produtores no local, ou ainda, por meio da adição de nutrientes que favoreçam o desenvolvimento das espécies selvagens produtoras destas substâncias. A produção microbiana dos biossurfatantes resulta na redução da tensão interfacial entre o meio e a célula microbiana, favorecendo o processo de captação das substancias hidrofóbicas pelos micro-organismos que são capazes de metabolizá-los.

Hua *et al.* (2003) comprovaram a eficiência do biossurfatante produzido por *Candida antarctica* na biodegradação de n-alcanos, enquanto que em testes comparativos utilizando os surfatantes químicos Tween 40 e Span 80, não foi observada a degradação dos hidrocarbonetos.

Makkar e Rockne (2003) atestaram a eficiência de biossurfatantes e de surfatantes sintéticos na biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos, cuja permanência no meio ambiente representou risco à saúde humana e aos ecossistemas. Os resultados mostraram que os biossurfatantes aumentaram a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos poliaromáticos tanto quanto os similares sintéticos, porém com a vantagem de ser uma molécula biodegradável e não tóxica para os micro-organismos degradadores e para os demais seres vivos.

Agricultura

Os pesticidas e fertilizantes comercialmente disponíveis apresentam efeitos negativos no meio ambiente. Estes produtos se acumulam no solo, e ao serem carreados pela chuva podem atingir rios e lençóis freáticos. Para evitar estes problemas, agentes de controle biológicos, como micro-organismos e metabólitos microbianos vêm sendo estudados para substituição dos agentes químicos (GHRIBI *et al.*, 2012).

A literatura descreve várias cepas de *Bacillus subtilis* como potenciais agentes de controle biológico. Phae, Shoda e Kubota (1990) relataram a eficácia do lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* no controle de fungos fitopatógenos. A inibição do crescimento de fungos parasitas em raízes de trigo também foi observada por Liu *et al.* (2009). Segundo Ongena e Jacques (2008), a eficácia dos metabólitos produzidos por

essa bactéria contra os diversos agentes patogênicos foi similar a dos pesticidas disponíveis no mercado.

Além do emprego em controle biológico, os biossurfatantes podem ser utilizados como emulsificantes nas formulações de herbicidas e pesticidas. Os princípios ativos desses produtos geralmente são moléculas hidrofóbicas, sendo necessário dispersá-los na fase aquosa. Desta forma, o produto final apresenta menor toxicidade (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Indústria Alimentícia

Os biossurfatantes apresentam grande potencial como aditivos alimentares devido às características apropriadas ao processamento e formulação de alimentos que possuem, tais como: formação e estabilização de emulsões, atividade antimicrobiana e baixa toxicidade (NITSCHKE; COSTA, 2007).

A formação de emulsões e a manutenção da sua estabilidade é o principal papel desempenhado pelos biossurfatantes em alimentos. Outras aplicações envolvem o aumento da vida de prateleira de produtos contendo amido, modificação das propriedades reológicas da farinha de trigo pela interação com o glúten, melhoria da consistência e textura de produtos a base de gordura, além de promover a solubilização de aromas (BARROS *et al*., 2007).

Produtos de higiene e cosméticos

Os surfatantes são utilizados em formulações cosméticas a fim de conferir ação detergente e espumante, além de poderem atuar como promotores de emulsificação, solubilização e dispersão dos componentes do produto. Baixa toxicidade e biodegradabilidade são alguns dos benefícios associados ao uso dos biossurfatantes em cosméticos. Por outro lado, o uso contínuo de produtos que contenham surfatantes sintéticos na sua formulação provoca reações a saúde humana, em geral, alergênicas.

Os tensoativos de origem microbiana apresentam propriedades interfaciais adequadas para aplicação cosmética. Os ramnolipídeos, os soforolipídeos e o lipídeo manosileritriol são considerados os de maior potencial para emprego em cosméticos (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009). Por exemplo, soforolipídeos e seus derivados agem como hidratantes, conferem uma textura agradável à pele e aos cabelos

e eliminam os efeitos adversos atribuídos aos hidratantes mais usados. São aplicados também em cremes labiais, sombras para os olhos e maquiagem em pó, apresentando boa qualidade e estabilidade (SHETE *et al.*, 2006).

Outras propriedades dos biossurfatantes, tais como atividade antioxidante e capacidade de estimulação de células epiteliais são exploradas para compor cosméticos faciais, loções e produtos para os cabelos. Além disso, a atividade antimicrobiana é essencial para evitar a contaminação diária decorrente do contato dos dedos com o creme (SHETE *et al.*, 2006).

Outras aplicações

O poder emulsificante dos biossurfatantes pode ser aproveitado em processos que utilizam polímeros, como nas indústrias de tintas, revestimentos, asfalto, cimento, têxtil e de fibras. Também é descrito o emprego dos biossurfatantes em carvoarias, na proteção de madeira (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000), nas indústrias de papel, cerâmica e de processamento de urânio (SHETE *et al.*, 2006).

III.4 – Produção de Biossurfatantes por *Bacillus subtilis*

A bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* já foi bem caracterizada fisiologicamente, devido ao importante papel que desempenha no meio ambiente, na medicina e na indústria. O interesse comercial deve-se principalmente a sua capacidade de secretar enzimas (amilases e proteases), além de seu uso na síntese de proteínas heterólogas (KUNST, 1997).

Em 1968, Arima *et al.* determinaram a presença um composto extracelular com propriedades tensoativas em cultivo de *Bacillus subtilis*. Este composto recebeu o nome de surfactina e sua estrutura foi descrita como a de um lipopeptídeo (KAKINUMA *et al.*, 1968). Desde então, mais de 30 diferentes lipoptídeos já tiveram sua síntese associada a cepas de *Bacillus* spp., ratificando o potencial deste gênero para produção de biossurfatantes (SOBERON-CHÁVEZ, 2011).

Sabe-se que a produção de biossurfatantes por *Bacillus subtilis*, um organismo aeróbico, esporulado e não patogênico, que pode ser encontrado no solo, na água ou associado a plantas (HONG *et al.*, 2008), é associada ao crescimento. Outra importante característica é que a presença de hidrocarbonetos no meio de cultivo, o que geralmente

aumenta a produção microbiana de biossurfatante, para esta espécie bacteriana tem efeito inibitório (COOPER *et al.*, 1981).

Os biossurfatantes produzidos por *Bacillus subtilis* são classificados em três famílias principais - iturinas, fengicinas e surfactinas – que diferem na composição da cadeia de ácido graxo ou na fração peptídica, cuja diversidade estrutural implica em variadas propriedades e, por conseguinte, diferentes campos de aplicação. A seguir uma breve descrição destes tipos de biossurfatantes.

Surfactinas

É o principal representante dos lipopeptídeos aniônicos. E o mais poderoso biossurfatante já documentado, cujo nome deve-se a sua excepcional atividade superficial (SEYDLOVÁ; CABALA; SVOBODOVÁ, 2011). A estrutura tridimensional desta molécula está representada na Figura II.14.

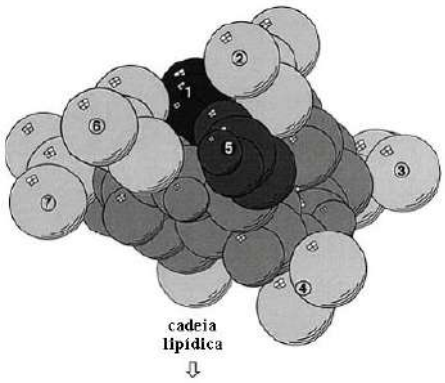


Figura III.14. Estrutura tridimensional da porção peptídica da surfactina. (PEYPOUX *et al.*, 1999 *apud* SEYDLOVÁ; CABALA; SVOBODOVÁ, 2011).

Os resíduos de glutamil e aspartil, localizados nas posições 1 e 5 respectivamente, respondem pelas duas cargas negativas da molécula (Figura II.14). A presença destes grupos possibilita que a surfactina se ligue a íons metálicos (especialmente cátions divalentes), resultando na melhoria das propriedades superficiais (THIMON *et al.*, 1993).

A natureza anfifílica da surfactina permite que esta molécula se associe a camadas lipídicas. Deste modo, pode intervir em membranas celulares biológicas. Na CMC, a surfactina causa o completo rompimento e solubilização da bicamada lipídica da membrana. Este comportamento pode explicar porque a surfactina apresenta atividade antiviral e antibacteriana (SOBERON-CHÁVEZ, 2011).

A tensão superficial da água é reduzida de 72 mN/m para 27 mN/m na presença da surfactina e a CMC é de aproximadamente 10 mg/L; menores valores já reportados na literatura (COOPER *et al.*, 1981). Normalmente, um biossurfatante considerado eficaz não reduz a tensão superficial a valores abaixo de 30 mN/m.

Iturinas

Grupo de lipopeptídeos com propriedades antifúngicas, sendo a Iturina A o principal representante. São caracterizadas por um anel peptídico constituído de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo (C_{14} a C_{17}), finalizada por um β-aminoácido.

Agem contra uma grande variedade de leveduras e fungos filamentosos patogênicos (MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994), por provocar a permeabilização da membrana. Este mecanismo é baseado na formação de canais iônicos, e não leva ao rompimento ou solubilização da membrana (ARANDA; TERUEL; ORTIZ, 2005).

Também possuem atividade tensoativa, porém são menos eficientes que a surfactina. Reduzem a tensão superficial da água de 72 para 43 $mN.m^{-1}$ e a CMC é de 20 mg/L (DELEU *et al.*, 1999).

Fengicinas

São compostos anfifílicos cíclicos constituídos de dez α-aminoácidos ligados a um ácido graxos β-hidroxilado. O comprimento da cadeia de ácido graxo varia de C_{14} a C_{18} (ONGENA *et al.*, 2007).

Apresentam propriedades antifúngicas, inibindo apenas o crescimento de fungos filamentosos. Portanto, são ineficazes para leveduras e bactérias (VANITTANAKOM; LOEFFLER, 1986).

III.4.1 – Fatores que Influenciam a Produção de Biossurfatante por *Bacillus subtilis*

O tipo, qualidade e quantidade do biossurfatante produzido dependem das condições de cultivo do micro-organismo produtor, isto é, temperatura, pH, agitação, aeração, fontes de carbono e nitrogênio, e disponibilidade de sais minerais (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). A otimização desses parâmetros auxilia na formulação de meios de cultura e condições ambientais que propiciem maximização do rendimento e da relação custo/benefício.

Fonte de Carbono

A síntese dos biossurfatantes geralmente acontece na presença de substâncias hidrofóbicas. Porém, observou-se que a produção por *Bacillus subtilis* se dá em meios que contêm fontes de carbono solúveis em água, principalmente carboidratos. De fato, a adição de hidrocarbonetos ou óleos vegetais ao meio de produção resulta em baixas concentrações de surfactina (ABUSHADY *et al.*, 2005).

Alguns rejeitos agroindustriais ricos em carboidratos já foram testados como fontes de carbono para a produção de biossurfatantes por *Bacillus subtilis*: (i) melaço, soro de leite, manipueira (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004; JOSHI *et al.*, 2008); (ii) resíduo líquido da produção de batata (FOX; BALA, 2000); (iii) melaço de tamareira (AL-BAHRY *et al.*, 2012); (iv) óleo de fritura residual (VEDARAMAN; VENJATESH, 2011); (v) rejeito da produção de óleo de soja (SITOHY *et al.*, 2010); e (vi) glicerina bruta subproduto da produção de biodiesel (FARIA *et al.*, 2011).

Fonte de nitrogênio

A fonte de nitrogênio também tem forte influência na quantidade de biossurfatante sintetizada, pois é um elemento essencial para a produção das enzimas responsáveis pelo processo de fermentação (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Os estudos conduzidos com diferentes compostos nitrogenados demonstraram que os maiores rendimentos são obtidos com o uso de fontes inorgânicas de nitrogênio, principalmente sais de amônio. Contudo, ureia, extrato de carne, extrato de levedo,

caseína hidrolisada, NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2S_2O_8$, NH_4Mo, $(NH_4)_2HPO_4$, $NH_4H_2PO_4$, NH_4HCO_3, e $NaNO_3$ já foram testadas (ABUSHADY *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 1997; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Sais minerais

O rendimento da fermentação pode ser melhorado através da complementação do meio de produção com sais minerais. O tipo e a concentração de sais desempenham um papel fundamental durante a síntese dos biossurfatantes, pois, além de atuarem como cofatores enzimáticos, participam do transporte de nutrientes através da membrana plasmática.

Segundo Cooper *et al.* (1981), a adição de sais de ferro e manganês estimula a produção de surfactina, enquanto outros sais adicionados ($ZnSO_4$, $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CoSO_4$, $Al_2(SO_4)_3$) não provocaram mudanças ou inibiram o crescimento microbiano e a produção do biossurfatante. Pyong *et al.* (2010) investigaram a produção de lipopeptídeos por *Bacillus subtilis* após adição de vários íons metálicos (Fe^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cs^{+}, Ni^{+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}). Por exemplo, o acréscimo do íon manganês resultou em aumento do rendimento.

Temperatura e pH

O efeito do pH na produção de biossurfatante por *Bacillus subtilis* foi estudado por Abushady *et al.* (2005). Um baixo rendimento de surfactina foi determinado quando o pH do meio de produção foi ajustado a valores inferiores a 6,5, sendo a concentração máxima de surfactina atingida para pH 6,5-7.

A maioria dos trabalhos realiza a síntese da surfactina a temperaturas na faixa de 25 a 35°C. Sem e Swaminathan (1997) observaram o efeito da temperatura sobre o rendimento de surfactina. A produção de surfactina foi máxima a 37,4°C. No entanto, Joshi *et al.* (2008) e Makkar e Cameotra (1997) obtiveram surfactina a temperatura de 45°C empregando linhagens termofílicas de *Bacillus subtilis*.

Agitação e Aeração

Os fatores ambientais, tais como agitação e disponibilidade de oxigênio também influenciam a produção de biossurfatante ao afetarem a atividade e o crescimento celular. Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) e Kim *et al.* (1997) confirmaram esta dependência ao observar que vazões de ar baixas ou muito vigorosas provocavam uma diminuição na síntese do biossurfatante, demonstrando que a transferência de oxigênio é um dos parâmetros-chave para a maximização do rendimento deste processo fermentativo.

A agitação está diretamente relacionada à formação de espuma no reator. A espuma cria problemas, incluindo a extração de produto, nutrientes e células do caldo de fermentação. Portanto, a eficiência do sistema é dependente da velocidade de agitação usada. Sistemas com agitação intensa (acima de 150 rpm) apresentaram baixa produção de surfactina (ABUSHADY *et al.*, 2005; LIU *et al*., 2007).

III.4.2 – Métodos de recuperação da Surfactina

Os processos de recuperação e purificação representam cerca de 60% das despesas de um processo biotecnológico. Assim, um fator determinante para a viabilidade econômica do projeto em escala comercial é a aplicação de processos *downstream* que sejam eficientes e de custo acessível.

Os métodos mais utilizados para a recuperação de biossurfatantes a partir do caldo de fermentação estão listados na Tabela III.5, onde também são descritas as vantagens e propriedades associadas a cada método. No entanto, a pureza obtida geralmente é baixa (< 50%). A extração com solventes orgânicos também é uma opção, porém estes compostos são nocivos para o ambiente, para a saúde humana e ainda podem prejudicar a atividade superficial do biossurfatante (CHEN; CHEN; JUAG, 2008).

Tabela III.5. Métodos de recuperação de biossurfatantes e suas vantagens

Processo de recuperação	Propriedade aproveitada para separação	Vantagens
Precipitação ácida	Biossurfatantes se tornam insolúveis em baixos valores de pH	Baixo custo, eficiente para recuperação de biossurfatante bruto.
Extração com solventes orgânicos	Biossurfatantes são solúveis em solventes orgânicos por possuírem porções hidrofóbicas	Eficiente para recuperação de biossurfatante bruto e purificação parcial, solvente pode ser recuperado.
Precipitação com sulfato de amônio	Salting-out	Eficaz para recuperação de alguns biossurfactantes poliméricos
Centrifugação	Precipitação dos biossurfatantes insolúveis através da força centrífuga	Reutilizável, eficiente na recuperação de biossurfatante bruto.
Espuma fracionada	Biossurfatantes, devido à atividade superficial, acumulam-se na espuma	Útil em processos contínuos de recuperação, alta pureza de produto.
Ultrafiltração	Biossurfatantes formam micelas, as quais são retidas por membranas poliméricas	Rápido, recuperação em estágio único, alto nível de pureza.
Adsorção em resinas poliméricas	Biossurfatantes são adsorvidos em resinas poliméricas e posteriormente removidos com solventes orgânicos	Rápido, recuperação em estágio único, alto nível de pureza, reutilizável.
Adsorção em carvão ativado	Biossurfatantes são adsorvidos e depois removidos com solventes orgânicos	Obtenção de biossurfatante puro, barato, reutilizável, recuperação em cultivo contínuo.
Cromatografia de troca iônica	Biossurfatantes aderem a resinas de troca iônica e são removidos com tampões	Alta pureza, reutilizável, rápida recuperação.

Fonte: MUKHERJEE; DAS; SEM (2006).

A técnica mais utilizada para a recuperação da surfactina é a precipitação ácida. Contudo, a pureza alcançada não ultrapassa 60%. Outros métodos vêm sendo desenvolvidos e sua aplicação em larga escala testada, tais como: recuperação da espuma produzida (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001), ultrafiltração e microfiltração (CHEN *et al.*, 2008; ISA; FRAZIER; JAUREGI, 2008; HWANG; WANG, 2012), adsorção em resinas poliméricas e em coluna de carvão ativo (LIU *et al.*, 2007), extração líquido-líquido e sólido-líquido (CHEN; JUANG, 2008), diálise, cromatografia de carga iônica e cromatografia de alta resolução. Estes procedimentos se aproveitam de

propriedades como a atividade superficial e a formação de micelas e vesículas para promover a separação do biossurfatante. (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

Normalmente, uma única etapa de processamento não é suficiente para efetuar a recuperação e purificação do produto. Uma estratégia de múltiplos estágios, utilizando uma sequência de processos de concentração é mais eficiente (CHEN *et al.*, 2008). Uma alternativa é a remoção contínua do biossurfatante durante a fermentação que aumenta a densidade celular no reator e minimiza os efeitos inibitórios do produto, resultando em um aumento no rendimento do tensoativo (DESAI; BANAT, 1997).

As etapas de recuperação e purificação são necessárias para eliminar compostos do caldo fermentado que possam interferir nas propriedades do biossurfatante. Entretanto, o tensoativo bruto ou parcialmente purificado, que é obtido nos estágios iniciais de recuperação, pode ser aplicado na recuperação de óleo, biorremediação, em tintas e na indústria têxtil. A pureza requerida pelas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos depende de várias etapas de purificação (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

III.5 - Avaliação Econômica

A avaliação econômica é um instrumento que auxilia o processo de planejamento e de tomada de decisão por engenheiros e investidores, além de selecionar as rotas que garantam a viabilidade do empreendimento.

O estudo econômico demanda um levantamento dos custos, investimentos e receitas referentes ao projeto. Estimar e acompanhar esses parâmetros permite que o projeto seja conduzido para a máxima geração de lucro.

III.5.1 – Custos e Investimentos

A determinação dos custos de qualquer processo de natureza comercial deve ser feita com precisão suficiente para embasar decisões confiáveis. O conhecimento dos distintos tipos de custos é essencial para que todos sejam incluídos na análise econômica e gerem uma estimativa realista. A Figura III.15 mostra a distribuição das despesas envolvidas no custo total de produção de uma planta química.

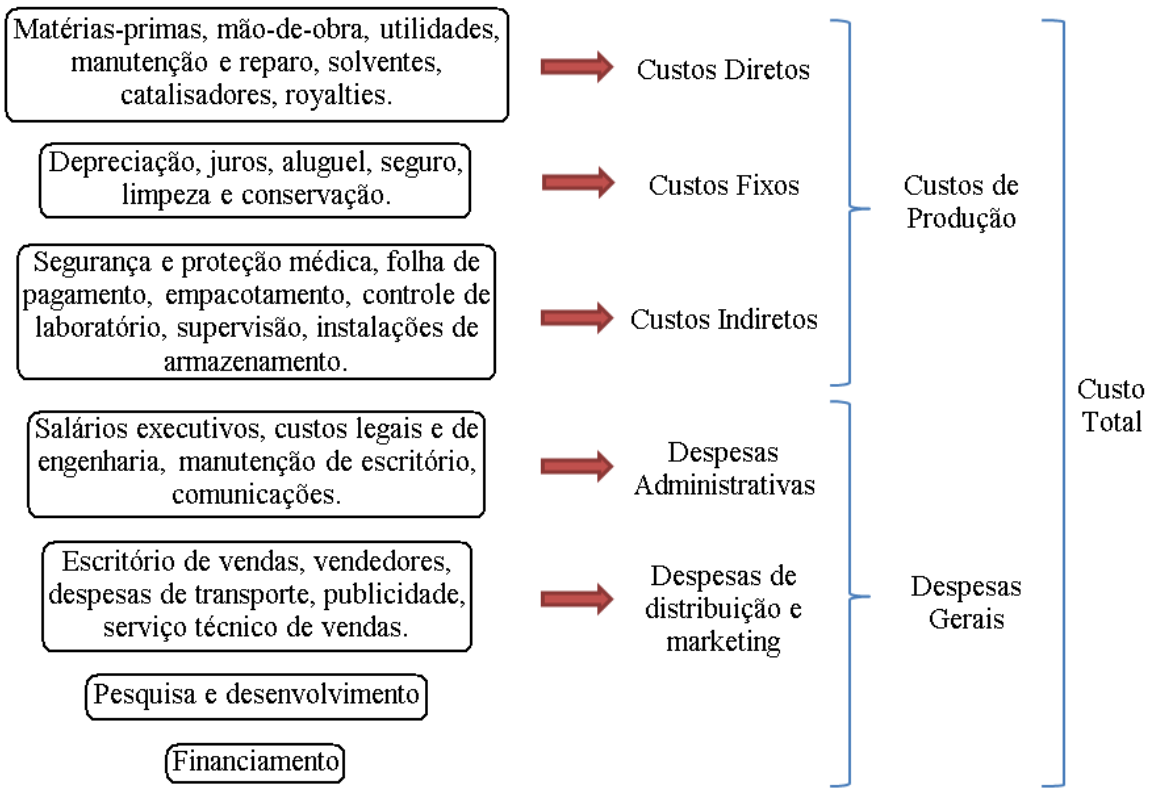


Figura III.15. Despesas envolvidas no custo total de produção de uma planta química (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

Os gastos que podem ser apropriados ao produto, ou seja, variam proporcionalmente à quantidade produzida ou consumida pela planta denominam-se custos diretos. Aqueles referentes à capacidade instalada da planta e independentes da produção são classificados como custos indiretos.

O investimento necessário para a realização de um processo é composto por dois tipos principais de capital:

1. Capital fixo: Destinado aos custos de engenharia, equipamentos físicos, peças de reposição e instalações da fábrica. Corresponde ao ativo fixo de uma empresa caracterizado por apresentar-se como bens tangíveis que não podem ser rapidamente convertidos em dinheiro.
2. Capital de giro: Montante que financia as atividades diárias do negócio, como pagamento de dívidas e salários, manutenção do estoque de matérias-primas e produtos, cobre eventuais gastos e situações emergenciais. Constitui o ativo circulante de uma empresa, representando a quantia que a entidade possui disponível em curto prazo, pois pode facilmente ser convertido em dinheiro.

Em uma análise de custos de processos industriais, o investimento necessário, os custos de produção e as despesas gerais, como imposto de renda, devem ser considerados.

III.5.2 – Indicadores Econômicos

Os critérios econômicos empregados na avaliação da atratividade de um plano de investimento se dividem em duas categorias definidas na Tabela III.6.

Tabela III.6. Critérios de rentabilidade

Critérios Econômicos	
Empíricos	Fundamentados em manuais desenvolvidos por quem possui experiência de campo, em especial os responsáveis pela fabricação de produtos. Apesar da falta de precisão e de não utilizarem teorias econômica, são adotados devido à simplicidade e fácil entendimento. Permitem estimar rapidamente a rentabilidade de um projeto com poucas informações disponíveis.
Baseados no valor presente	Construídos a partir de aplicações detalhadas ou simplificadas de regras do cálculo econômico. Utilizam dados incompletos, assumidos ou de credibilidade variável, cujo tratamento não exige grande vigor.

Fonte: CHAUVEL, FOURNIER e PIGEYRE, 2003

A seguir, serão descritos os principais indicadores financeiros, que se baseiam no conceito de valor presente líquido e na análise do fluxo de caixa.

1. Valor presente líquido: Compara o valor atual de uma quantidade de dinheiro com o valor da mesma quantidade em uma data futura. É uma ferramenta utilizada para avaliar projetos em longo prazo. Consiste no somatório do valor presente das saídas de caixa e o valor presente das entradas de caixa.
2. Taxa interna de retorno (TIR): É a taxa de desconto que faz com que o valor presente líquido do projeto seja nulo. Define uma taxa de desconto a qual torna o valor presente de uma série de investimentos igual ao valor presente do retorno desse investimento. O projeto é atrativo quando sua TIR for maior do que o custo de capital do projeto.

3. Tempo de retorno (Payback time): É o período necessário para o retorno do valor de um investimento, ou seja, refere-se ao tempo decorrido até a reposição do capital aplicado inicialmente.
4. Retorno sobre investimento (ROI): Relação entre o dinheiro ganho ou perdido e o montante investido. Quanto maior o ROI mais vantajoso economicamente é o projeto

III.5.3 – Software SuperPro Design

Ferramentas computacionais permitem que um grande número de alternativas e ideias seja analisado em um curto período de tempo. Desta forma, a solução ótima de um processo pode ser rapidamente encontrada.

Com o processamento digital de informações é possível reunir as variáveis envolvidas em um projeto de engenharia e obter os dados necessários para a sua avaliação preliminar, os quais serão usados no planejamento de investimentos, pesquisas, orçamentos e nas fases futuras de aprimoramento e implantação do projeto.

SuperPro Design é um simulador de processos biotecnológicos desenvolvido pela empresa Intelligent, Inc. que conta com ferramentas de modelagem, avaliação e otimização de processos integrados.

O programa realiza a análise de custo e a avaliação econômica dos processos simulados. Estima a viabilidade de um projeto de planta industrial, levando em conta as escalas laboratoriais, piloto e industrial.

Capítulo IV – Formulação de Meios de Baixo Custo para a Produção do Biossurfatante

IV.1 – Materiais e Métodos

IV.1.1 – Micro-organismo

Foi empregada uma cepa da bactéria *Bacillus subtilis*, isolada do *Landfarming* da Refinaria Duque de Caxias (REDUC) da Petrobras, e identificada pelo Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob coordenação do Dr Leon Rabinovitch.

A cultura foi mantida em meio inclinado Agar Nutriente (item IV.1.2.1, acrescido de 30 g/L de agar-agar), a 4±2°C, após 24 h de incubação em estufa bacteriológica a 30±2°C para permitir o crescimento microbiano. Repiques foram efetuados mensalmente a fim de manter a viabilidade da cultura estoque.

IV.1.2 – Meios de Cultura

IV.1.2.1 – Meio de Crescimento

A propagação da cultura bacteriana foi realizada no meio Caldo Nutriente, constituído de (em g/L): peptona de carne 5,0; extrato de lêvedo 3,0; glicose 5,0; (pH 7).

IV.1.2.2 – Meio de Produção

Para a produção do biossurfatante foi utilizado um meio composto de açúcar cristal e levedura residual de cervejaria (LRC), em diferentes proporções, que será posteriormente detalhado.

IV.1.3 – Descrição da Etapa Experimental

IV.1.3.1 – Preparo do Inóculo

A bactéria foi ativada através do repique da cultura estoque para tubo contendo meio Agar Nutriente inclinado (IV.1.2.1, acrescido de 30 g/L de agar-agar). Em seguida, o cultivo foi incubado em estufa bacteriológica a 30±2°C por 24 h.

Uma quantidade correspondente a duas alçadas da cultura ativada foi transferida para 100 mL do meio de crescimento (item IV.1.2.1) em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL. Os frascos foram então alocados em agitador rotatório (Controlled Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co, USA) a 150 rpm e 30±1°C, por 16 h. A Figura IV.1 ilustra o processo de preparo do inóculo.

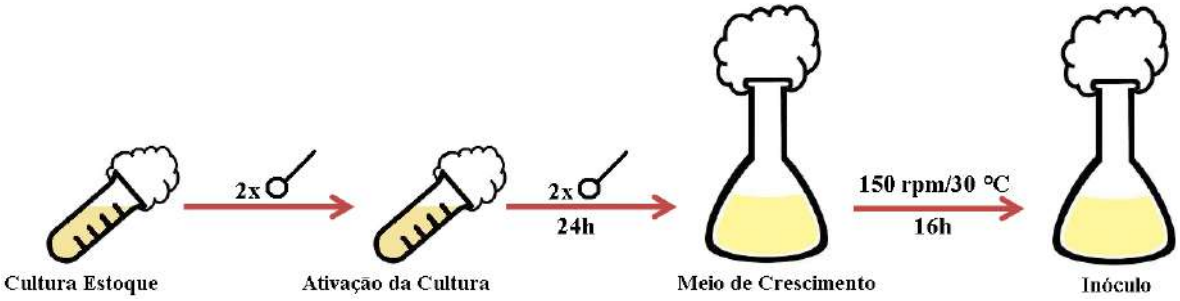


Figura IV.1. Representação do processo de preparo do inoculo.

IV.1.3.2 – Síntese do Biossurfatante por *Bacillus subtilis*

A produção do biossurfatante foi conduzida em frascos Erlenmeyers com capacidade para 500 mL contendo 150 mL de meio de produção, onde foram semeados 15 mL de cultura recém-propagada de *B. subtilis* (item IV.1.2.1). Os cultivos foram incubados a temperatura de 25±1°C, em agitador rotatório (Controlled Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co, USA), sob agitação de 150 rpm, por 48 h. Ao término do processo fermentativo, as células bacterianas foram separadas do caldo fermentado por centrifugação (Centrífuga Refrigerada NT 815, Biovera) a 3.500 rpm, durante 30 minutos, e temperatura de 4±1°C. O esquema realizado para a produção de biossurfatante é mostrado na Figura IV.2.

Com o caldo fermentado livre de células, foram feitas análises de tensão superficial com o objetivo de avaliar a produção do biossurfatante. Amostragens foram efetuadas com 24 e 48 h de fermentação.

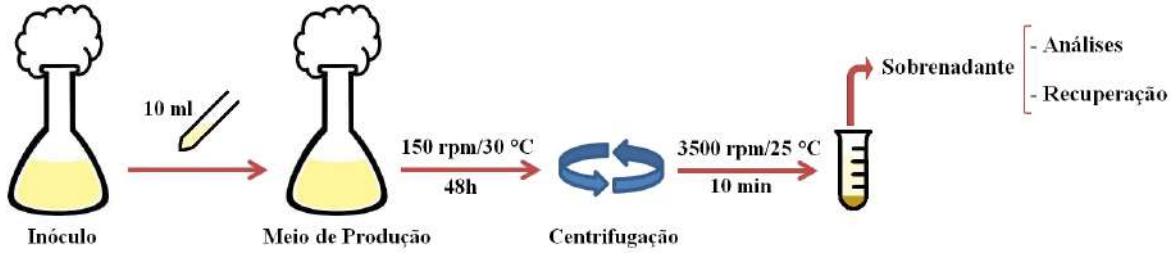


Figura IV.2. Esquema dos procedimentos utilizados para produção do biossurfatante.

Inicialmente, a produção do biossurfatante foi realizada em meio mineral, constituído (em g/L) de: $NaNO_3$ 4,0; KH_2PO_4 3,0; Na_2HPO_4 6,0; $CaCl_2.2H_2O$ 0,01; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2. Esta base mineral tem sido usada por vários autores no preparo de meios para produção de biossurfactante por *B. subtilis* (COOPER, 1981; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998; REIS; SÉRVULO; DE FRANÇA, 2004; VALPUESTA, 2008). Ao meio mineral foram acrescidos de 10 g/L de açúcar cristal e 5 mL/L de solução de micronutrientes (VALPUESTA, 2008).

A produção de biossurfatante também foi avaliada em meio formulado com matérias-primas de baixo custo. Segundo Mukherjee, Das e Sem (2006) um dos fatores que limitam a expansão da produção de biossurfatantes é o preço da matéria-prima. Para tanto foi empregado 10 g/L de açúcar cristal como principal fonte de carbono, por ser esta uma matéria-prima barata, abundante e de fácil obtenção em algumas partes do território nacional. Como fonte de nitrogênio basal foi utilizado um rejeito da indústria cervejeira - biomassa residual (LRC, levedura residual cervejeira) - acompanhada ou não de nitrato de sódio como fonte complementar de nitrogênio. Para fins comparativos também foram avaliados meios constituídos de peptona e extrato de levedura. Na Tabela IV.1 estão listados os meios avaliados.

No caso da LRC, o rejeito primeiramente solubilizado em água destilada, foi a seguir filtrado em papel Whatman para a remoção dos *debris* celulares em suspensão. O açúcar cristal foi adicionado, e o pH ajustado para 7,0 por meio da adição de solução 0,1

M de NaOH. O meio foi então esterilizado por autoclavação a 0,5 atm (110 °C) por 15 min.

Tabela IV.1. Meios de produção: Formulações testadas

Meio de produção	Peptona (g/L)	Extrato de lêvedo (g/L)	Levedura residual cervejeira (LCR) (g/L)	$NaNO_3$ (g/L)
Meio 1	5,0	3,0		
Meio 2			4,0	4,0
Meio 3			7,5	
Meio 4			15,0	
Meio 5			30,0	

IV.1.4 – Métodos Analíticos

IV.1.4.1 – Tensão Superficial

Visto que os biossurfatantes são capazes de reduzir a tensão superficial do meio em que se encontram, este parâmetro foi adotado como indicador da presença e atividade do tensoativo. As determinações da tensão superficial foram realizadas em tensiômetro modelo KRUSS.

IV.2 – Resultados e Discussão

A tensão registrada após 48 h de fermentação do meio mineral acrescido de 10 g/L de açúcar cristal foi de 42,09 ± 1,84 mN/m. Importante destacar que em trabalho anterior realizado pelo grupo, o crescimento desta cepa bacteriana em meio de mesma composição foi capaz de reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 30 mN/m.

Considerando que a surfactina é capaz de provocar o abaixamento da tensão superficial da água de 72 para 28 mN/m (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968), conclui-se que a produção do biossurfatante não foi satisfatória.

Por outro lado, os valores medidos em amostras procedentes do meio de crescimento foram de 32,45 ± 0,19 e 23,26 ± 0,10 mN/m após 24 e 48 h de fermentação, respectivamente. A redução da tensão em relação ao valor inicial do meio (59,45 ± 0,36

mN/m) pode ser atribuída a produção de biossurfatante. O tempo de processo mais adequado à obtenção do tensoativo foi de 48 h quando se obteve o menor valor de tensão superficial.

Os valores de tensão superficial para os meios formulados (Tabela IV.1) são mostrados na Tabela IV.2. O emprego de peptona como fonte de nitrogênio (meio 1) não propiciou a síntese do tensoativo. Do mesmo modo, o emprego de nitrato de sódio em associação a LRC (meio 2) não estimulou a produção de biossurfatante. Note que o emprego da LRC como única fonte de nitrogênio favoreceu a síntese microbiana do bioproduto. No entanto, a produção foi inversamente proporcional ao aumento da quantidade de LRC no meio. A composição do meio 3 foi a que mais estimulou a produção do biossurfatante.

Tabela IV.2. Valores de tensão superficial determinados após fermentação nas diferentes formulações testadas

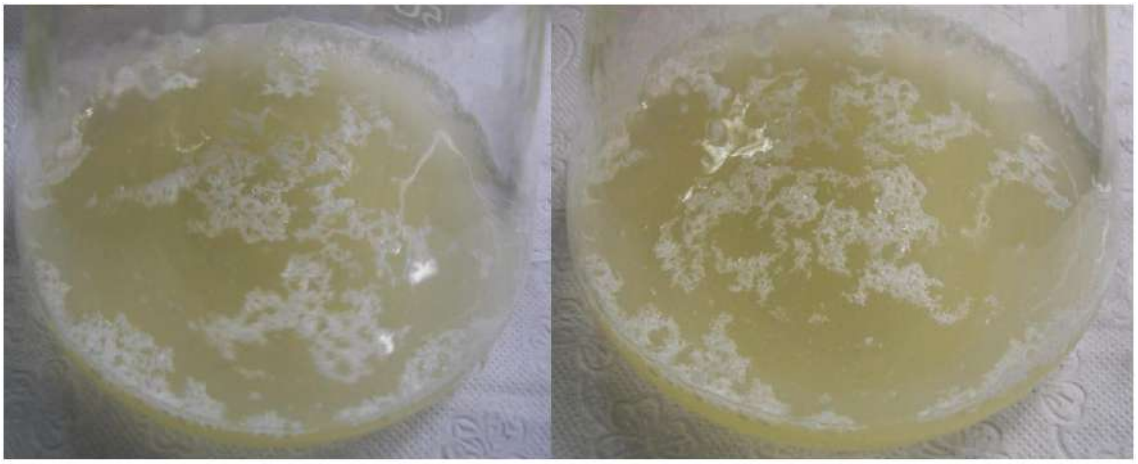
Meio de produção	Tensão Superficial (mN/m)
Meio 1	42,09 ± 0,59
Meio 2	45,03 ± 0,36
Meio 3	26,70 ± 0,21
Meio 4	30,60 ± 0,31
Meio 5	39,90 ± 0,32

Composição dos meios (Tabela IV.1)

À medida que o biossurfatante vai sendo excretado no meio, a agitação do caldo fermentado provoca a formação de espuma, tal como mostrado na Figura IV.3.

A Figura IV.4 mostra o aspecto da espuma após 60 e 120 minutos do fim da fermentação. Percebe-se que o volume da espuma sofreu pouca alteração no decorrer do tempo, mesmo não estando mais sob agitação; esta estabilidade é um indicativo da produção de biossurfatante.

Figura IV.3. Aspecto do caldo fermentado com detalhe da formação de espuma ao término do processo fermentativo.



(a) (b)

Figura IV.4. Aspecto da espuma após (a) 60 e (b) 120 minutos do fim da fermentação.

O biossurfatante acumulado na espuma pode ser recuperado através da coleta da espuma produzida e seu posterior tratamento. Este método de recuperação aumenta drasticamente a produção de surfactina em larga escala, pois a remoção da espuma estimula a produção de mais surfactina (COOPER *et al*., 1981).

Capítulo V – Avaliação da Estabilidade do Biossurfatante Produzido

V.1 – Materiais e Métodos

V.1.1 – Produção/Recuperação do Biossurfatante

Nesta etapa foi feita a fermentação de 1 L de meio 3 (Tabela IV.1) que consiste de 10 g/L de açúcar cristal e 7,5 g/L de LRC. A recuperação do biossurfatante bruto do caldo fermentado, livre de células, foi efetuada por precipitação ácida (GHOJAVAND *et al.*, 2008). Para tanto foi feita a adição lenta de HCl 1M até que o pH atingisse o valor de 2. O caldo foi mantido por 12 h sob temperatura de 4±2°C, para permitir a precipitação do bioproduto, que em seguida foi separado do caldo fermentado por centrifugação a 10.000 rpm durante 20 min. O produto foi liofilizado e pesado. A ilustração do procedimento adotado para a recuperação do biossurfatante é mostrada na Figura V.1. De acordo com Chen e Juang (2008) e Shaligram e Singhal (2010), a pureza da surfactina obtida desta forma é de aproximadamente 55%.

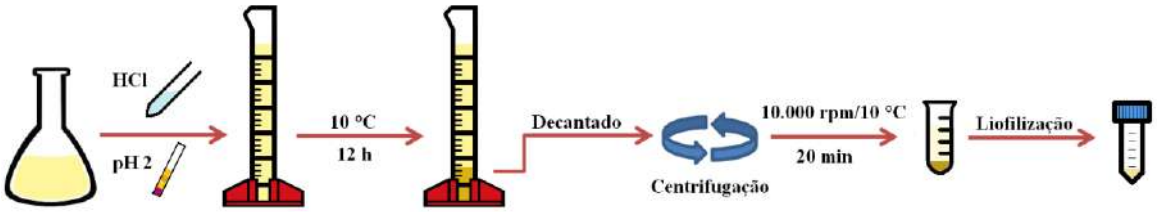


Figura V.1. Representação do processo de recuperação do biossurfatante do caldo fermentado.

Na Figura V.2 pode ser observada a precipitação do biossurfatante por acidificação do caldo fermentado.

Figura V.2. Precipitado obtido após acidificação do meio

V.1.2 – Ensaio de Estabilidade

A estabilidade do biossurfatante foi examinada em diferentes relações de temperatura e pH, como mostra a Figura V.3. Para tanto, foi preparada uma solução contendo 100 mg/L de biossurfatante pela dissolução do composto liofilizado em água destilada.

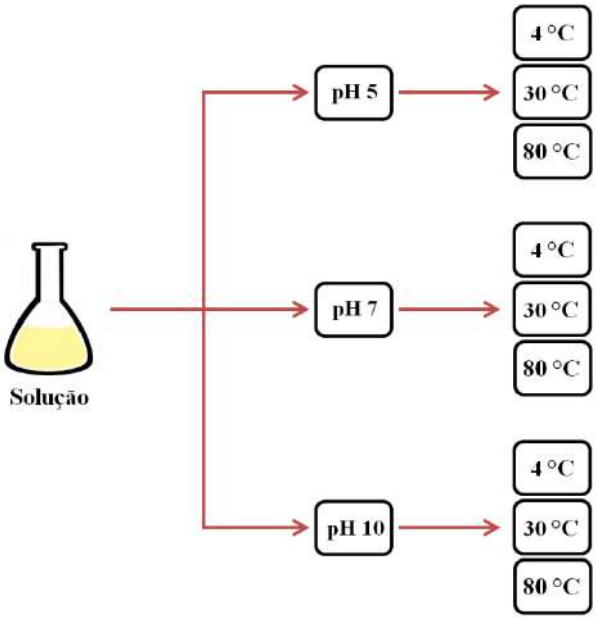


Figura V.3. Condições adotadas para o ensaio de estabilidade.

Conforme ilustrado na Figura V.3, o pH de diferentes amostras (50 mL) do bioproduto liofilizado e solubilizado em água foi ajustado a 5, 7 e 10, pela adição de NaOH 1M ou HCL 1M. Em seguida, cada amostra foi mantida em diferentes

temperaturas (4, 30 e 80°C). Após 15 minutos e 24 h de exposição às condições estabelecidas foram determinadas as tensões superficiais dos meios. As amostras foram estabilizadas a temperatura ambiente antes da realização das medidas.

A partir da solução de 100 mg/L de biossurfantes foi realizada análise cromatográfica para avaliação do perfil estrutural dos compostos tensoativos produzidos.

V.1.3 – Métodos Analíticos

V.1.3.1 – Tensão Superficial

Para a determinação da tensão superficial foi utilizado em tensiômetro modelo Sigma 70.

V.1.3.2 – Análise Cromatográfica

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada empregando o cromatógrafo LC10A – Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa de octadecilsilano (C-18) de 250 x 4,9 mm, no laboratório do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN)

A fase móvel consistiu de uma mistura das soluções 20% (v/v) de 3,8 mM de ácido trifluoracético (TFA) e 80% (v/v) de acetonitrila. A vazão de eluição foi de 1 mL/min e o detector utilizado foi UV a 206 nm (WEI; CHU, 1998). O volume de injeção foi de 20 µL da amostra previamente filtrada.

V.2 – Resultados e Discussão

A massa de sólido obtida após a acidificação de 1 L de caldo fermentado foi de 404,0 mg. Portanto, a concentração de biossurfatante bruto produzido foi de 0,4 g/L.

O resultado é consistente com os dados de rendimentos relatados em outros trabalhos (Tabela V.1). Contudo, o meio utilizado neste trabalho é composto de matérias-primas de baixo custo, enquanto os resultados informados na Tabela V.1 foram

obtidos pela fermentação de meios sintéticos ou semissintéticos por cepas de *Bacillus subtilis.*

Tabela V.1. Produtividade da surfactina em diferentes meios de produção.

Meio	(mg de surfactina/L)	Referências
Semissintético	100	Arima *et al.*, 1968.
Sintético	250	Cooper *et al.*, 1981.
Sintético	800 (na espuma)	Cooper *et al.*, 1981.
Hidrolisado de carne	160	Shaligram; Singhal, 2010 *apud* Sheppard; Mulligan, 1987.
Sintético	350	Shaligram; Singhal, 2010 *apud* Drouin; Cooper, 1992.
Semissintético	250	Shaligram; Singhal, 2010 *apud* Ohno; Ano; Shoda, 1992.
Semissintético	350	Shaligram; Singhal, 2010 *apud* Ohno; Ano; Shoda, 1992.
Sintético	550	Shaligram; Singhal, 2010 *apud* Mulligan; Chow; Gibbs, 1989.

Fonte: SHALIGRAM; SINGHAL (2010)

A estabilidade é uma propriedade determinante para a aplicabilidade do tensoativo. A indústria de petróleo é um mercado potencial para os biossurfatantes, onde as preparações impuras podem ser aplicadas. No entanto, o produto muitas vezes precisa resistir às condições ambientais drásticas, como é o caso da aplicação em reservatórios de óleo.

Os valores de tensão superficial, iniciais (10 min de exposição) e finais (24 h), estão listados na Tabela V.2. Pode-se concluir que não houve alteração significativa dos valores em função do pH e temperatura no tempo decorrido, indicando que o biossurfatante é estável em toda a faixa de condições testadas. Mas, note-se que na concentração de biossurfatante adotada para o teste, 100 mg/L, o produto foi pouco eficaz como agente tensoativo. Importante ressaltar que o biossurfatante encontrava-se parcialmente recuperado (aproximadamente 50% de pureza).

Tabela V.2. Efeito de diferentes condições de temperatura e pH sobre a estabilidade da atividade tensoativa do biossurfatante produzido.

pH	Temperatura (	Tensão Inicial (mN/m)	Tensão Final (mN/m)
5	4	52,53 ± 0,49	51,83 ± 0,74
	30	52,32 ± 0,98	55,32 ± 1,15
	80	52,28 ± 0,98	53,16 ± 0,90
7	4	52,07 ± 0,91	53,68 ± 1,38
	30	53,91 ± 0,75	52,08 ± 0,80
	80	51,32 ± 0,67	53,90 ± 1,18
10	4	53,09 ± 0,42	53,99 ± 0,87
	30	54,43 ± 0,46	55,85 ± 0,90
	80	49,56 ± 0,82	48,03 ± 0,30

Os surfatantes comerciais demonstram maior estabilidade do que a surfactina em ambientes ácidos. Isto fica evidente abaixo de pH 4, quando ocorre a precipitação do biossurfatante. No entanto, acima de pH 5 a surfactina apresenta melhores propriedades tensoativas quando comparada aos surfatantes químicos mais utilizados (VAZ *et al.*, 2012).

Também foi avaliado o perfil cromatográfico (Anexo 1) do biossurfatante, após a extração com diferentes solventes (clorofórmio e éter). Observou-se ausência de picos que permitam identificar os componentes estruturais do tensoativo. Deve-se esse resultado a possível interferência provocada pelo sal formado na neutralização, e pelos compostos do meio de cultura não eliminados durante a recuperação.

Capítulo VI – Simulação do Processo Industrial de Produção de Biossurfatante

A produção comercial de surfactina limita-se a pequenas quantidades destinadas ao uso em pesquisa e desenvolvimento. As empresas Sigma-Aldrich, Showa Denko e Kanekas são as atuais produtoras deste biossurfatante.

O processo de obtenção da surfactina em larga escala através da fermentação por *Bacillus subtilis* foi simulado com o uso do programa SuperPro Design (versão 6.0). Este projeto contempla o desenvolvimento do fluxograma, seleção e dimensionamento dos equipamentos e balanço material do processo.

Informações sobre os processos adotados pelos fabricantes não estão disponíveis, portanto as operações propostas para a simulação foram baseadas nos procedimentos realizados em laboratório (itens IV.1.3, V.1.1) e em dados retirados da literatura.

Considerou-se para o desenvolvimento dos cálculos que a planta opera 24 horas/dia por 330 dias/ano (7920h/ano).

VI.1 – Dados da Simulação

VI.1.1 – Operações e Equipamentos

As operações unitárias que compõe o processo se encontram listadas na Tabela IV.1.

Tabela VI.1. Operações unitárias e equipamentos empregados durante o processo

Equipamento	Operação
Centrífuga	Separação sólido/líquido
Compressor de Ar	Suprimento de Ar
Decantador	Separação sólido/líquido
Esterilizador	Esterilização
Fermentador de Inóculo	Propagação do inóculo
Fermentador	Converter substrato em produto
Filtro de Ar	Eliminar a contaminação do ar
Filtro Prensa	Retirar partículas em suspensão
Secador	Secagem do produto
Tanques	Estocagem e mistura de material

VI.1.2 – Parâmetros de Dimensionamento dos Equipamentos

Os parâmetros da Tabela IV.2 devem ser informados para o cálculo da dimensão e do custo dos equipamentos. Os valores apresentados correspondem ao padrão adotado pelo software e foram os utilizados na simulação.

Tabela VI.2. Parâmetros de dimensionamento dos equipamentos do processo

Equipamento	Parâmetros
Centrífuga	Fator sigma máximo: 220.000 m²
Compressor de Ar	Potência máxima: 3000 kW
Decantador	Volume máximo: 80.000 L Razão comprimento/diâmetro: 5 Ocupação máxima permitida: 90%
Esterilizador	Volume máximo: 80.000 L Razão comprimento/diâmetro: 3 Ocupação máxima permitida: 90%
Fermentador de Inóculo	Volume máximo: 50.000 L Razão altura/diâmetro: 3 Ocupação máxima permitida: 90%
Fermentador	Volume máximo: 350.000 L Razão altura/diâmetro: 3 Ocupação máxima permitida: 90%
Filtro de Ar	Vazão máxima: 14.400.000 L/h
Filtro Prensa	Área máxima de filtração: 80 m² Espessura máxima da torta: 15 cm
Secador	Diâmetro máximo: 10 m Razão altura/diâmetro: 3
Tanque Vertical	Volume máximo: 40.000 L Razão altura/diâmetro: 3 Ocupação máxima permitida: 90%
Tanque Vertical de Fundo Plano	Volume máximo: 200.000 L Razão altura/diâmetro: 3 Ocupação máxima permitida: 90%

VI.1.3 – Parâmetros de Operação

O cálculo do consumo de utilidades e do tempo de ocupação por cada equipamento depende da natureza e duração das operações realizadas por ele. A Tabela IV.6 relaciona o tempo demandado por cada operação que compõe os equipamentos do processo.

Tabela VI.3. Tipos e duração das operações realizadas na produção do biossurfatante

Equipamento	Operações	Tempo (minutos)
Tanque (1)	Carga-1	5
	Carga-2	5
	Agitação	5
	Transferir para Esterilizador (1)	10
	Limpeza (CIP)	15
Esterilizador (1)	Receber do Tanque (1)	10
	Pressurizar	60
	Aquecer	60
	Resfriar	60
	Transferir para Fermentador (1)	10
	Limpeza (CIP)	15
Fermentador (1)	Receber do Esterilizador (1)	10
	Fermentação	960
	Transferir para Fermentador (2)	10
	Limpeza (CIP)	15
	Limpeza (SIP)	15
Compressor de Ar (1)	Compressão	960
Filtros de Ar (1) e (2)	Filtração	960
Tanque (2)	Carga-1	5
	Carga-2	10
	Agitação	10
	Transferir para Filtro	15
	Limpeza (CIP)	15
Filtro Prensa	Filtração	60
	Limpeza da Torta	15
Tanque (3)	Receber do Filtro	15
	Carga-1	10
	Carga-2	10
	Transferir para Esterilizador (2)	15
	Limpeza (CIP)	15
Esterilizador (2)	Receber do Tanque (3)	15
	Pressurizar	60
	Aquecer	60
	Resfriar	80
	Transferir para Fermentador (2)	15
	Limpeza (CIP)	15
Fermentador (2)	Receber do Esterilizador (2)	15
	Receber do Fermentador (1)	10
	Fermentação	2880
	Transferir para Centrífuga	15
	Limpeza (CIP)	15
	Limpeza (SIP)	15
Compressor de Ar (2)	Compressão	2880
Filtros de Ar (3) e (4)	Filtração	2880

Tabela VI.3. Continuação

Equipamento	Operações	Tempo (minutos)
Centrífuga	Centrifugação	60
	Limpeza (CIP)	15
Tanque (4)	Receber da Centrífuga	15
	Carga-1	5
	Agitação	10
	Reagir	10
	Resfriar	15
	Transferir para Decantador	15
	Limpeza (CIP)	15
Decantador	Decantação	720
	Limpeza (CIP)	15
Secador	Secagem	360
	Limpeza (CIP)	15

CIP (*cleaning in place*): Limpeza química de equipamentos
SIP (*sterilization in place*): Esterilização de equipamentos

VI.1.4 – Balanços de Massa e Energia

O balanço de massa visa estabelecer as vazões mássicas das correntes de entrada e saída de cada equipamento. A execução do balanço requer a introdução de um conjunto de variáveis e parâmetros que dependem do tipo de operação realizada, tais como: rendimento, porosidade, eficiência, umidade, coeficientes estequiométricos etc.

O balanço de energia avalia o fluxo energético que demandam as trocas de calor e o funcionamento dos equipamentos. Ao estabelecer o tempo e as temperaturas de operação, a energia consumida pelo processo é calculada automaticamente pelo simulador.

VI.1.4.1 – Filtro Prensa

A filtração tem por objetivo remover os resíduos celulares que permanecem em suspensão após a solubilização da levedura residual de cervejaria. Considerou-se que 90% das células de levedura foram removidas na filtração.

VI.1.4.2 – Fermentador de Inóculo

As matérias-primas formam um meio homogêneo no tanque de mistura que é repassado para o esterilizador. O meio esterilizado é fermentado para o crescimento da biomassa que servirá de inóculo para a produção de surfactina. A reação que expressa o processo que ocorre no interior do fermentador de inóculo é mostrada abaixo:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + O_2 + NH_3 \rightarrow \text{Biomassa} + \text{Proteínas} + H_2O + CO_2$$

A amônia foi usada para simplificar a representação das moléculas advindas da levedura residual de cervejaria que fornecem o nitrogênio para a fermentação. Considerou-se para o ajuste da concentração NH_3 que a levedura residual de cervejaria possui 6,4% de nitrogênio por grama.

O rendimento da fermentação de propagação do inóculo foi calculado de modo a gerar uma quantidade de biomassa que estabeleça uma concentração inicial de células de 0,05 – 0,1 g/L em peso seco no fermentador principal.

O componente proteínas visa contabilizar os produtos secundários formados na fermentação.

VI.1.4.3 – Fermentador

A reação abaixo expressa a obtenção da surfactina através da fermentação dos substratos contidos no meio de produção. A partir desta reação balanceada o simulador calcula a vazão de ar necessária para a aeração e a energia consumida pelo sistema de agitação

$$C_{12}H_{22}O_{11} + O_2 + NH_3 \rightarrow \text{Biomassa} + \text{Proteínas} + \text{Surfactina} + H_2O + CO_2$$

O rendimento da fermentação foi estabelecido de acordo com o valor obtido no procedimento experimental (Item V.2).

VI.1.4.4 – Centrifugação

A eficiência da centrifugação é calculada pelo simulador com base nos valores de diâmetro e densidade da partícula solida limitante, além do tempo de residência no equipamento.

VI.1.4.5 – Precipitação da Surfactina

À corrente que deixa a centrífuga é adicionado ácido clorídrico. O meio ácido provoca a formação de cristais de surfactina e a precipitação de outros compostos, como proteínas. Segue a reação que representa o processo de precipitação ácida:

$$\text{Surfactina} + \text{HCl} \rightarrow \text{Cristal de Surfactina} \downarrow + \text{H}^{+} + \text{Cl}^{-}$$

VI.1.4.6 – Decantação

A eficiência de decantação adotada foi de 97% (SHALIGRAM e SINGHAL, 2010). A operação foi simulada sob refrigeração (10°C) a fim de diminuir a solubilidade da surfactina e aumentar a fração recuperada.

VI.1.4.5 – Secagem

A umidade final da corrente de saída do secador foi fixada em 0,05% como sugere o simulador como valor padrão. A secagem do produto foi realizada através de aspersão de ar quente.

VI.2 – Avaliação Econômica

As ferramentas de cálculo econômico do software SuperPro Desing (versão 6.5) foram utilizadas para estimar o investimento necessário para a implantação de uma unidade industrial de produção de surfactina, os custos de produção, o preço de venda e a viabilidade do projeto.

A rentabilidade foi avaliada a partir dos dados gerados pela simulação em conjunto com os parâmetros econômicos listados na Tabela VI.4. O principal critério de

análise utilizado foi o valor presente líquido (VPL). Outros indicadores como taxa interna de retorno (TIR), retorno do investimento, tempo de retorno (payback) e margem bruta também foram calculados.

Os dados gerados pelo simulador foram convertidos com a cotação do dólar em agosto de 2012: R$ 2,01 para US$ 1,00.

Tabela VI.4. Parâmetros necessários ao cálculo dos indicadores econômicos do projeto

Parâmetros de Tempo		
Período de Construção	30 meses	
Tempo de Partida	4 meses	
Duração do Projeto	15 anos	
Inflação	4% a.a.	
Taxas		
Juros	Baixo	7%
	Médio	9%
	Alto	11%
Impostos	35%	
Depreciação		
Período de Depreciação	10 anos	
Valor de Descarte	5% Custos Fixos	

VI.2.1 – Custos dos Materiais

A Tabela VI.5 relaciona o custo das matérias-primas e das utilidades presentes no processo.

Tabela VI.5. Preço dos insumos consumidos na obtenção da surfactina

Matérias-Primas	
Material	**Preço**
Açúcar Cristal	R$ 1,25/kg
Levedura Residual Cervejeira	R$ 0,50/ton
HCl	R$ 0,20/kg
Utilidades	
Água	R$ 9,57/m³
Eletricidade	R$ 257,67/MWh
Vapor	R$ 8,49/ton
Água de Resfriamento	R$ 0,20/ton
Água Gelada	R$ 0,81/ton

O custo da água foi obtido junto a CEDAE (RJ) e corresponde a tarifa cobrada para indústrias cujo consumo máximo de água é de 20 m³/mês sem tratamento de esgoto. O valor cobrado pelo fornecimento de energia elétrica foi consultado na Agência Nacional de Energia (ANEEL) e é referente à taxa média para indústrias.

Os preços são relativos ao ano de 2012 e podem variar conforme a região de instalação da planta.

Para o vapor, água de resfriamento, água gelada e HCl foram adotados os valores fornecidos pelo simulador.

VI.2.2 – Custos da Mão-de-obra

Utilizou-se a quantidade de dois salários mínimos, que corresponde cada ao valor de R$ 622,00 (ano de 2012), como a remuneração mensal de um operador que cumpre uma jornada de trabalho de 40h semanais. Anualmente, cada operador recebe um total de 13 salários. Assim, o custo da mão-de-obra pode ser estimado em R$ 8,42 por hora trabalhada por operador.

VI.2.3 – Custos Fixos

Na Tabela VI.6 são apresentados os fatores adotados para a estimativa de custos fixos.

Tabela VI.6. Fatores adotados para a estimativa dos custos fixos do processo

Custos Fixos (CF)		Cálculo
Custos Diretos (CD)	Tubulação (A)	0,35 x CE
	Instrumentação (B)	0,40 x CE
	Isolamento (C)	0,03 x CE
	Elétrica (D)	0,10 x CE
	Construções (E)	0,45 x CE
	Melhoramentos (F)	0,15 x CE
	Facilidades Auxiliares (G)	0,40 x CE
Custos Indiretos (CI)	Engenharia	0,25 x CD
	Construção	0,35 x CD
Outros Custos (OC)	Empreiteira	0,05 x (CD +CI)
	Contingência	0,10 x (CD+CI)

CE = Custo de Equipamentos
CD = CE + Instalação + A + B + C + D + E + F + G
CF = CD + CI + OC

VI.3 – Resultados da Simulação

VI.3.1 – Fluxograma

O fluxograma gerado na simulação está representado na Figura VI.1. O processo foi dividido em três partes:

- Preparo do Inóculo: Etapa destinada à multiplicação dos micro-organismos a fim de obter uma concentração adequada para dar início à fermentação.
- Fermentação: Conversão do substrato no produto desejado por ação do agente microbiano.
- Recuperação Primária: Extração do produto do mosto fermentado, obtendo surfactina com baixo grau de pureza.

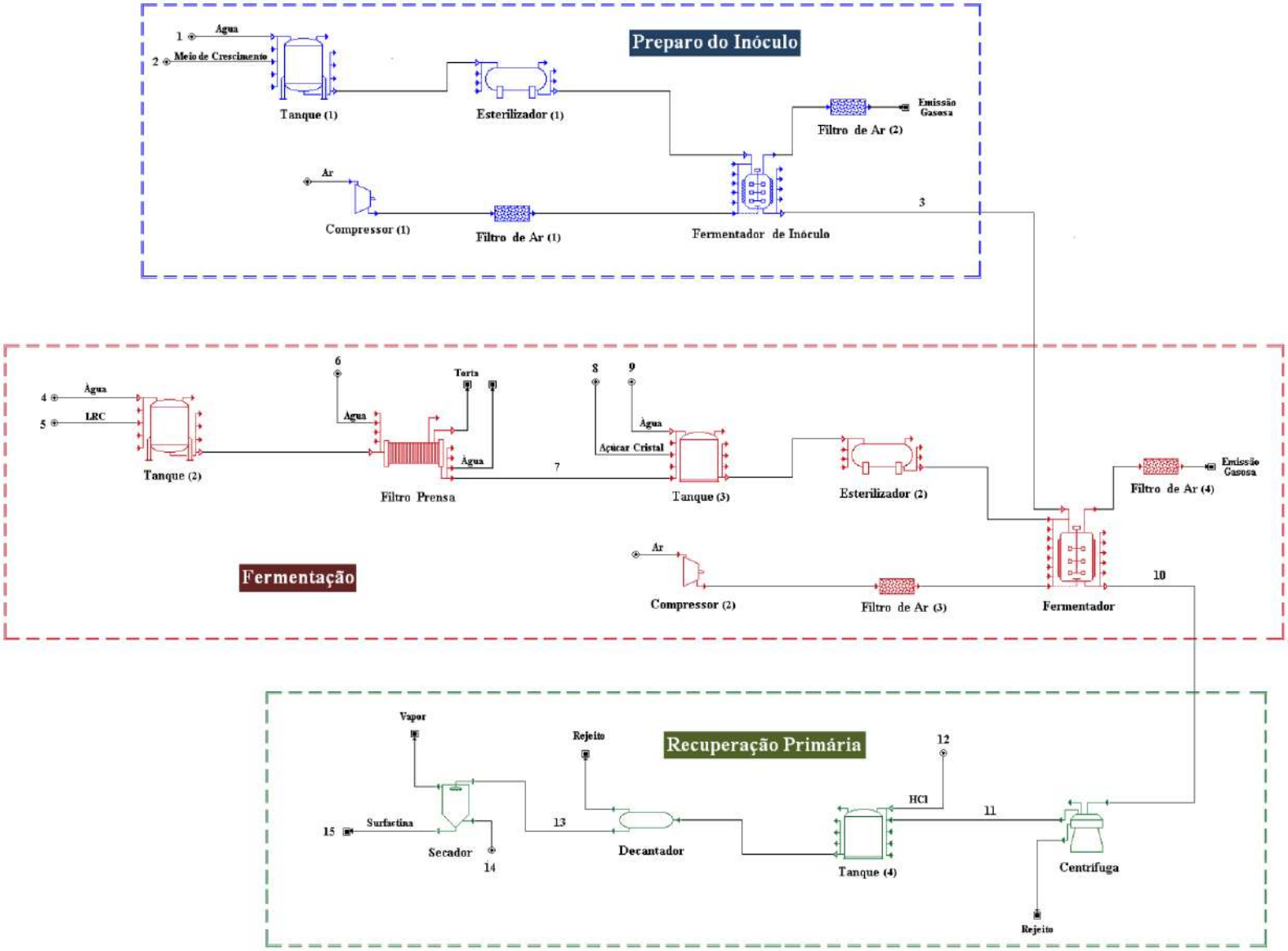


Figura VI.1. Fluxograma da planta de produção de surfactina.

VI.3.2 – Balanço de Massa do Processo

As Tabelas VI.7, VI.8 e VI.9 apresentam as vazões mássicas das correntes da planta. As correntes gasosas não foram representadas, pois não interferem significativamente no processo.

Tabela VI.7. Vazão mássica das correntes da etapa de preparo do inóculo (1 a 3)

	Corrente		
Componente (kg/batelada)	**1**	**2**	**3**
Água	9700		9719
LRC			
Açúcar Cristal		50	4,9
NO3		10	5,7
Biomassa			9,5

Tabela VI.8. Vazão mássica das correntes da etapa de fermentação (4 a 10)

	Corrente						
Componente (kg/batelada)	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Água	10.000		100	9941	950	85.000	104.700
LRC		200		1			1,1
Açúcar Cristal							82,6
NO3				60			5,6
Biomassa							19,2
Surfactina							37,2

Tabela VI.9. Vazão mássica das correntes da etapa de recuperação primária (11 a 15)

	Corrente				
Componente (kg/batelada)	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
Água	104.341		3135		
LRC					
Açúcar Cristal	82,6		4		4
NO3	5,6				
Biomassa	3				
Proteínas	1,7		1,3		1,3
Surfactina	40		38		38
HCl		100			
Vapor				15670	

VI.3.3 – Dimensionamento

As dimensões, a quantidade e o material dos equipamentos do processo estão listados na Tabela VI.10.

Tabela VI.10. Capacidade e material dos equipamentos do processo

Quantidade	Equipamento	Capacidade	Material
2	Centrífuga	Fator sigma: 153.290,78 m²	Aço Carbono
1	Compressor de Ar (1)	Potência: 26,06 kW	Aço Carbono
1	Compressor de Ar (2)	Potência: 281,66 kW	Aço Carbono
2	Decantador	Volume: 58.852,87 L	Aço Inox 316
1	Esterilizador (1)	Volume: 53.453,5 L	Aço Carbono
2	Esterilizador (2)	Volume: 100.900,53 L	Aço Carbono
1	Fermentador de Inóculo	Volume: 12.267,5 L	Aço Carbono
1	Fermentador	Volume: 132.500 L	Aço Carbono
1	Filtro de Ar (1)	Vazão: 52.908,57 L/h	Aço Carbono
1	Filtro de Ar (2)	Vazão: 257.289,4 L/h	Aço Carbono
1	Filtro de Ar (3)	Vazão: 571.828, 96 L/h	Aço Carbono
1	Filtro de Ar (4)	Vazão: 3.213.095,06 L/h	Aço Carbono
1	Filtro Prensa	Área de Filtração: 50,14 m²	Aço Carbono
1	Secador	Volume: 5.223,63 L	Aço Inox 316
1	Tanque (1)	Volume: 10.888,55 L	Aço Carbono
1	Tanque (2)	Volume: 11.315,96 L	Aço Carbono
1	Tanque (3)	Volume: 106.789,7 L	Aço Carbono
1	Tanque (4)	Volume: 117.550,54 L	Aço Inox 316

VI.3.4 – Diagrama de Gantt

O diagrama de Gantt possibilita ilustrar a ocupação dos recursos de um projeto. Atua como uma ferramenta de controle de produção onde é possível analisar o avanço das etapas do processo.

A Figura VI.2 representa a distribuição e duração das operações realizadas durante uma batelada.

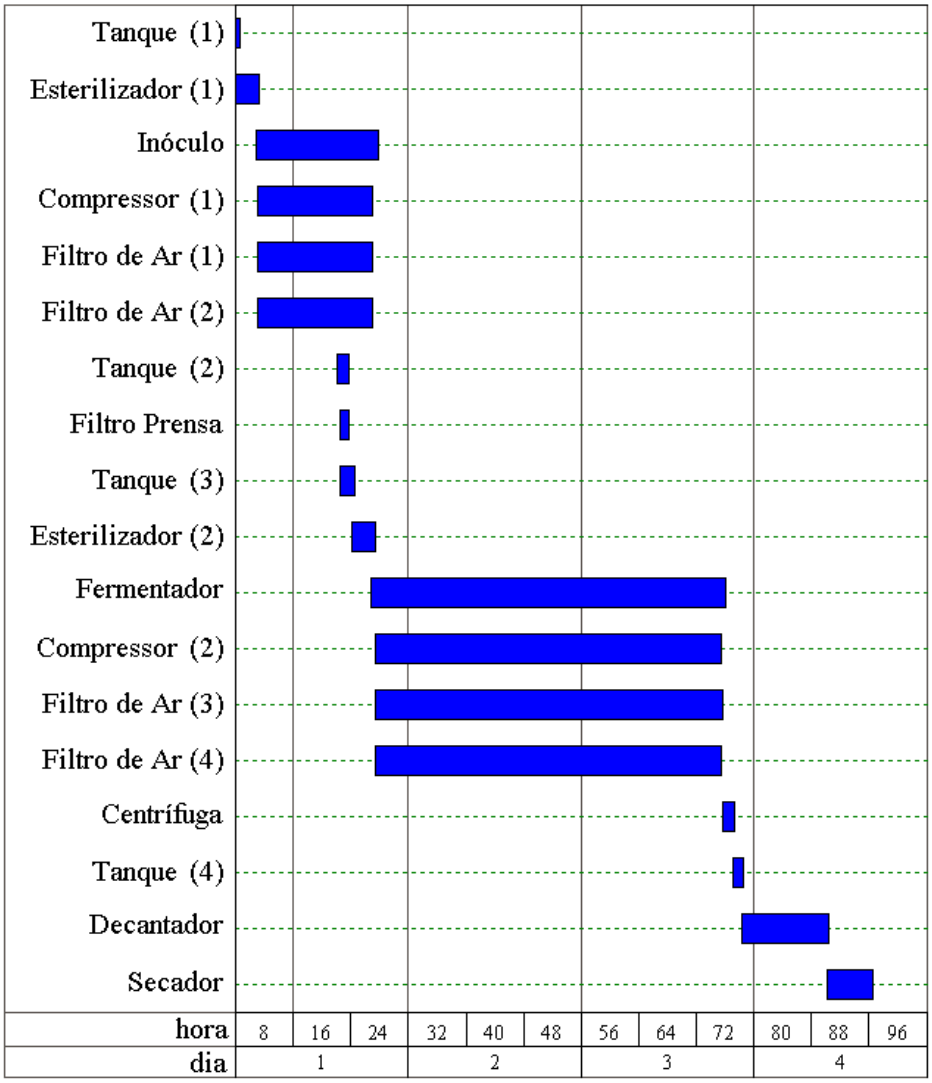


Figura VI.2. Diagrama de Gantt correspondente a uma batelada do processo de produção de surfactina.

A análise do gráfico fornece os dados apresentados na Tabela VI.11. Sabendo que é possível iniciar uma batelada sem que a anterior tenha sido finalizada, o programa

calcula o tempo do ciclo mínimo, e a partir deste valor projeta o número máximo de bateladas possíveis em um ano.

Tabela VI.11. Parâmetros globais da simulação

Parâmetros Globais	
Tempo de Operação	7.883,21 h/ano
Tempo de Batelada	88,55 h
Tempo do Ciclo	49,33h
Número de Bateladas por Ano	159

VI.4– Resultados da Avaliação Econômica

VI.4.1 – Custos de Investimento

Os custos de investimento referem-se aos dispêndios efetuados para montagem da indústria. Isso inclui os equipamentos usados na produção (Tabela VI.12), as instalações e materiais necessários para o funcionamento das maquinas, além da construção de edifícios industriais e obras de infraestrutura (Tabela VI.13).

Tabela VI.12. Custo dos equipamentos

Quantidade	Equipamento	Custo Unitário (R$)	Custo Total (R$)
2	Centrífuga	426.220	852.440
1	Compressor de Ar (1)	109.080	109.080
1	Compressor de Ar (2)	240.380	240.380
2	Decantador	616.100	1.232.200
1	Esterilizador (1)	46.460	46.460
2	Esterilizador (2)	133.320	266.640
1	Fermentador de Inóculo	385.820	385.820
1	Fermentador	1.276.640	1.276.640
1	Filtro de Ar (1)	32.320	32.320
1	Filtro de Ar (2)	32.320	32.320
1	Filtro de Ar (3)	36.360	36.360
1	Filtro de Ar (4)	36.360	36.360
1	Filtro Prensa	262.600	262.600
1	Secador	321.180	321.180
1	Tanque (1)	22.826	22.826
1	Tanque (2)	24.240	24.240
1	Tanque (3)	84.840	84.840
1	Tanque (4)	238.360	238.360

Tabela VI.13. Custos Diretos e Indiretos

Custos Diretos	
Item	**Valor (R$)**
Equipamentos	6.848.922
Instalação	3.055.811
Tubulações	2.397.066
Instrumentação	2.739.344
Isolamento	205.366
Elétrica	684.555
Construções	3.081.622
Melhorias de Terreno	1.026.833
Facilidades Auxiliares	2.739.344
Custo Direto Total	22.778.863
Custos Indiretos	
Item	**Valor (R$)**
Engenharia	5.695.277
Construção	7.973.388
Empreiteira	1.822.488
Contingência	3.644.977
Custos Fixos Totais	41.914.993

Adicionalmente aos custos indiretos, consideram-se as despesas com empreiteiras e contingências.

VI.4.2 – Custos de Operação

Os custos de operação abrangem os gastos realizados a fim de manter a unidade industrial em funcionamento. As despesas desta natureza incluem a mão-de-obra (Tabela VI.14), matérias-primas (Tabela VI.15) e utilidades consumidas pela produção (Tabela VI.16).

O custo total de operação está computado na Tabela VI.17 e a divisão destes custos está ilustrada na Figura VI.3.

Tabela VI.14. Custos de Trabalho (com impostos)

Tipo	Custo Unitário (R$/hora)	Trabalho Anual (h)	Custo Anual (R$)
Operador	37,17	23.371	868.700

Tabela VI.15. Custos de Matéria-prima

Matéria-Prima	Total Consumido (kg)	Custo Anual (R$)
Ar	32.002.025	0
Água	33.695.530	323.477
Açúcar Cristal	151.050	188.812
LRC	41.340	20,67
HCl	15.900	3.211
Total	65.905.845	515.520

LRC – levedura residual cervejeira

Tabela VI.16. Custo de Utilidades

Utilidade	Consumo Anual	Custo Anual
Água Gelada	671.791.658 kg	542.807
Água de Refrigeração	188.019.159 kg	37.979
Eletricidade	4.888.820 kWh	1.259.702
Vapor	4.287.559 kg	36.401
Total	-	1.876.889

Tabela VI.17. Custo anual de operação

Item	Custo (R$)
Matéria-prima	515.520
Trabalho	868.600
Instalações	7.882.040
Laboratório	131.300
Utilidades	1.876.889
Tratamento de Rejeito	165.640
Total	11.439.989

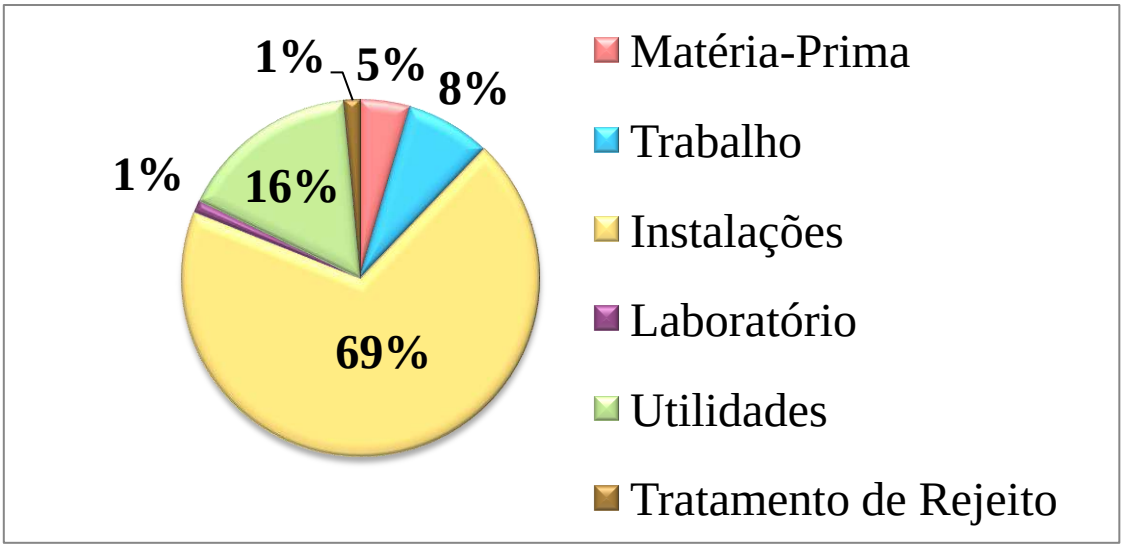


Figura VI.3. Distribuição dos custos de operação.

De acordo com a estimativa de Desai e Banat (1997), o custo da matéria-prima representa de 10 a 30% do valor final do biossurfatante. Em decorrência do emprego de um meio de cultura de baixo custo, as despesas com matéria-prima neste projeto foram de 4,5% do total investido para a produção do tensoativo.

Destaca-se o pequeno valor direcionado ao tratamento de rejeitos gerados no processo. A produção de biossurfatantes não utiliza a maioria dos compostos tóxicos necessários à síntese dos tensoativos sintéticos, portanto gera uma quantidade inferior e menos tóxica de efluentes industriais.

VI.4.3 – Custo de Produção

Com uma capacidade produtiva de 6.034,52 kg/ano e capital total de R$ 11.439.989 necessários à produção, obtém-se o custo unitário de R$ 1.895,7 por kg de surfactina. Porém, de acordo com Makkar, Cameotra e Banat (2011), o cenário ideal seria de biossurfatantes com preços na faixa de U$ 6-11/kg.

VI.4.4 – Preço de Venda

Segundo Chauvel (2003), a taxa de retorno sobre o investimento média (ROI) é de 30 a 35%. Para uma dada taxa, a expressão abaixo permite calcular o preço de venda do produto.

$$\boxed{\mathrm{ROI} = \frac{\mathrm{V} - \mathrm{C}}{\mathrm{I}} \mathrm{x}\, 100} \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:

$$\mathrm{V}\ (\text{preço de venda}) = \frac{\text{Receita anual}}{\text{Capacidade de produção}}$$

$$\mathrm{C}\ (\text{custo unitário de produção}) = \frac{\text{Custo de operação anual}}{\text{Capacidade de produção}}$$

$$\mathrm{I}\ (\text{investimento unitário}) = \frac{\text{Investimento (capital depreciável)}}{\text{Capacidade de produção}}$$

O preço de mercado da surfactina (98% de pureza) vendida pela empresa Sigma-Aldrich é de U$ 153/10 mg. Este biossurfatante não é comercializado impuro, como o obtido através do método simulado. No entanto, outros biossurfatantes, especialmente ramnolipídeos, estão disponíveis em diferentes graus de pureza (Tabela VI.18).

Tabela VI.18. Preços de venda para biossurfatantes do tipo ramnolipídeos

Pureza do Ramnolipídeo	Preço (U$/kg)
5%	200
25%	525
50%	3.000
75%	7.500
90%	10.000
95%	25.000

Fonte: Agae Technologies (www.agaetech.com/catalog)

Adotando 30% como o retorno do investimento, o preço mínimo de venda calculado da surfactina é de U$ 2100,00/kg. Este valor é 30 % inferior ao cobrado por biossurfatantes do tipo ramnolipídeos (50% de pureza), o que sugere a possibilidade da surfactina ser uma alternativa mais barata no mercado de biossurfatantes.

VI.4.5 – Indicadores Econômicos

A partir do fluxo de caixa projetado para o período de funcionamento da fábrica (Tabela VI.19), obtêm-se os indicadores econômicos relacionados na Tabela VI.20.

Tabela VI.19. Fluxo de caixa (milhões de reais)

Ano	Investimentos	Rendimentos	Custo Operacional	Lucro Bruto	Depreciação	Rendimentos Tributáveis	Impostos	Lucro Líquido	Fluxo de Caixa Líquido
1	-11,205	0	0	0	0	0	0	0	-11,205
2	-14,940	0	0	0	0	0	0	0	-14,940
3	-11,487	11,450	9,013	2,392	3,548	2,392	0,837	5,103	-6,384
4	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
5	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
6	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
7	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
8	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
9	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
10	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
11	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
12	0	22,811	10,228	12,582	3,548	12,582	4,404	11,727	11,727
13	0	22,811	6,680	16,130	0	16,130	5,646	10,485	10,485
14	0	22,811	6,680	16,130	0	16,130	5,646	10,485	10,485
15	2,150	22,811	6,680	16,130	0	16,130	5,646	10,485	12,634

Tabela VI.20. Indicadores de rentabilidade para o processo de produção de surfactina

Indicador	Valor (R$)
Capital Total	44.327.777
Custo Operacional	11.439.989
Margem Bruta	49,6 %
Retorno Sobre o Investimento	30 %
Tempo de Retorno	3,37 anos
Taxa Interna de Retorno	25,55 %
Valor Presente Líquido	31.106.877

Apesar do elevado investimento inicial, gera-se lucro a partir de três anos de operação, um curto período de tempo para indústrias. A análise do valor presente líquido e da taxa interna de retorno (Tabela VI.20) revela o bom desempenho da unidade de produção. Os demais indicadores, como margem bruta e retorno sobre o investimento, apresentaram valores condizentes com o esperado. Em geral, todos os indicadores revelam que o projeto é economicamente atrativo.

Os valores obtidos podem ser comparados aos indicadores de outros projetos a fim de avaliar o método de produção de biossurfatante mais rentável.

Capítulo VII – Conclusões

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- A linhagem de *Bacillus subtilis*, isolada de solo contaminado com hidrocarbonetos e metais pesados, foi capaz de sintetizar composto com propriedades tensoativas a partir de **açúcar cristal**, matéria-prima de baixo custo e abundante no Brasil, e rejeito da indústria cervejeira (**levedura residual**);

- A fermentação, durante 48 h, do meio composto por 7,5 g/L de levedura residual de cervejaria e 10 g/L de açúcar cristal propiciou o menor valor de tensão superficial (26,70 ± 0,21 mN/m);

- O biossurfatante produzido apresentou estabilidade em pH 5 a 10, e temperatura de 4 a 80°C, sugerindo a possibilidade de emprego em condições ambientais mais drásticas;

- Os indicadores econômicos calculados mostraram, preliminarmente, que o investimento no processo simulado é economicamente viável.

Capítulo VIII - Referências Bibliográficas

ABUSHADY, H.M.; BASHANDY, A.S.; AZIZ, N.H.; IBRAHIM, H.M.M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and de factors affecting its production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.7, n.3, p. 337-344, 2005.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, In Press, Corrected Proof**,** *2012.*

ARANDA, FJ.; TERUEL, JA.; ORTIZ A. Futher aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptídeo iturin A. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1713, n.1, p. 51-56, 2005.

ARIMA K, KAKINUMA A, TAMURA G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 488-494, 1968.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v.51, p. 1-12, 1995.

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

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA- JÚNIOR, M. R.; PASTORE,G.M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para AplicaçãoemAlimentos. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 409-414, 2007.

BUENO, S. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. (2008). (Doutorado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p. 262-266, 2004.

CHAUVEL, A.; FOURNIER, G.; PIGEYRE, R. **Manual of Process Economic Evaluation**. Paris: Editions Technip, 2003.

CHEN, H.; CHEN, Y.; JUANG, R. Recovery of surfactin from fermentation broth by a hybrid salting-out membrane filtration process. **Separation and Purification Technology**, v.59, p. 244-252, 2008.

CHEN, H.; JUANG, R. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p. 39-46, 2008.

CHEN, H.; LEE, Y.; WEI, Y.; JUANG,R. Purification of surfactin in pretreated fermentation broth by adsorptive removal of impurities. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p. 452-459, 2008.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 915-929, 2002.

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

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 346-354, 2001.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; JACQUES, P.; THONART, P.; PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.152, p. 3-10, 1999.

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

DROUIN, C.M.; COOPER, D.G. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineerin,** v.40, p. 86-90, 1992.

DUARTE, M. S. Caracterização de bactérias produtoras de ramnolipídeos isoladas de poços de petróleo. (2003). (Pós-Graduação) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

EXEROWA, D.; KRUGLYAKOV, P. M. **Foam and foam films: Theory, experiment, application**. 1.ed.: Elsevier, 1997.

FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C_{14}/Leu_7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1951-1957, 2011.

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

FLEURACKERS, S.J.J. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, p. 5-12, 2006.

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

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E,; SHAHRAKI, A.K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 172-176, 2008.

GHRIBI, D.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; ELLEUCH, M.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; TOUNSI, S. The impact of the *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant on the midgut histology of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and determination of its putative recptor. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 183-186, 2012.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptídeo biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration**. Biotechnology Research International**, v. 2011, ID 653654, 6 pages, 2011.

HIRATA, Y.; RYU, M.; ODA, Y.; IGARASHI, K.; NAGATSUKA, A,; FURUTA, T.; SUGIURA, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.108, n. 2, p. 142-146, 2009.

HONG, H.A.; HUANG, J.-M.; KHANEJA, R.; HIEP, L. V.; URDACI, M. C.; CUTTING, S. M. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n.2, p. 317-624, 2008.

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

HWANG, K.; WANG, C. Microfiltration characteristics of *Bacillus subtilis* fermentation broths. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 347-353, 2012.

ISA, M.H.M.; FRAZIER, R.A.; JAUREGI, P. A futher study of the recovery and purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 176-182, 2008.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C; JHA, S; YADAV, D; NERURKAR A.; DESAI A J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v.99, n 1, p. 195-199, 2008.

KAKINUMA, A.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Wetting of fibrina plate and apparent promotion of fibrinolysis by surfactin, a new bacterial peptidelipid surfactante. **Experientia**, v.24, p. 1120-1121, 1968.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77, n.1, p. 116-126, 1999.

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

KUNST, F. et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v.390, n.20, p. 249-256, 1997.

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

LIU, T.; MONTASTRUC, L.; GANCEL, F.; ZHAO, L.; NIKOV, I. Integrated process for production of surfactin Part 1: Adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, p. 333-340, 2007.

LIU, B.; QIAO, H.; HUANG, L.; BUCHEBAUER, H.; HAN, Q.; KANG, Z. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, v. 29, p. 277-285, 2009.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v.31, p. 255-261, 2009.

MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v.87, p. 151-174, 1994.

MAKKAR, RS.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p. 37-42, 1997.

MAKKAR, RS.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMD Express**, v.1, 2011.

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

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

MULLIGAN, C.N.; CHOW, T.Y.K.; GIBBS, B.F. Enchanced biosurfactant production by a mutant Bacillus subtilis strain. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v.31, p. 486- 489, 1989.

MYERS, D.Surfactant Science and Technology. 3ª ed.: Wiley Interscience, 2006.

NITSCHKE, M. COSTA, SGVA, Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 252-259, 2007.

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

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

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant Bacillus subtilis. **Biotechnology Letters,** v. 14, p. 1165-1168, 1992.

ONGENA, M.; EMMANUEL, J.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORLS, B.; ARPLGNY, J.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p. 1084-1090, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipoptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v.16, n.3, p 115-125, 2008.

PARIA, S.; KHILAR, K. C. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid-water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.100, p.75-95, 2004.

PETERS, M.A.; TIMMERHAUS, K.D. **Plant Design and Economics for Chemical Engineers**. 4ª ed. McGraw-Hill,1991.

PHAE, C.G.; SHODA, M.; KUBOTA, H. Supperssive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. **Journal of Fermentations and Bioengineering**, v. 69, n.1, p 1-7, 1990.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude

biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1589-1595, 2007.

PYOUNG, K.; RYU, J.; KIM, Y.H.; CHI, Y. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 138-145, 2010.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potencial applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p. 609-618, 2006.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, p. 229-236, 2001.

ROSEN, M. J. Surfactants and Interfacial Phenomena. 3. ed.: Wiley Interscience, 2004. (ROSEN, 2004)

SAHARAN, BS.; SAHU, RK.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentations, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, 2011.

SAKAI, T. Surfactant-free emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, p. 228-235, 2008.

SANTOS, F.K.G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D; DUTRA, T. V.; NETO, E. L. B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. **P&D PETRO**, 4.,2007.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, foams,and suspensions: Fundamentals and applications**.: Wiley-VCH, 2005.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p. 358-363, 1997.

SEYDLOVÁ, G.; CABALA, R.; SVOBODOVÁ, J. Surfactin – Novel solutions for global issues. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. InTech, 2011.

SHALIGRAM, N.S.; SINGHAL, R.S. Surfactin – A review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technology and Biotechnology,** v. 48, p. 119-134, 2010.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by Bacillus subtilis grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 27, p. 110-116, 1987.

SHETE, A.M.; WADHAWA, G.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 65, p. 91-115, 2006.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n.3, p 142-146, 2004.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.319, p.291-297, 2004.

SITOHY, M.Z.; RASHAD, M.M.; SHAROBEEM, S. F.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U.; KASHEF, A. S. Bioconversion of soy processing waste for production of surfactants. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, p. 2811-2821, 2010.

SOBERON-CHÁVEZ, G. **Biosurfactants: from genes to applications**. Microbiology Monographs, v.20.:Springer, 2011.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, G. Ionophorous and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.1, p. 57-62, 1993.

VALPUESTA, R.R.F. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima renovável e de baixo custo. (2008). (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W. Fengycin – A novel antifungal lipoptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **The Journal of Antibiotics**, v.39, n.7, p. 888-901, 1986.

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

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.28, n.2, p. 175-180, 2011.

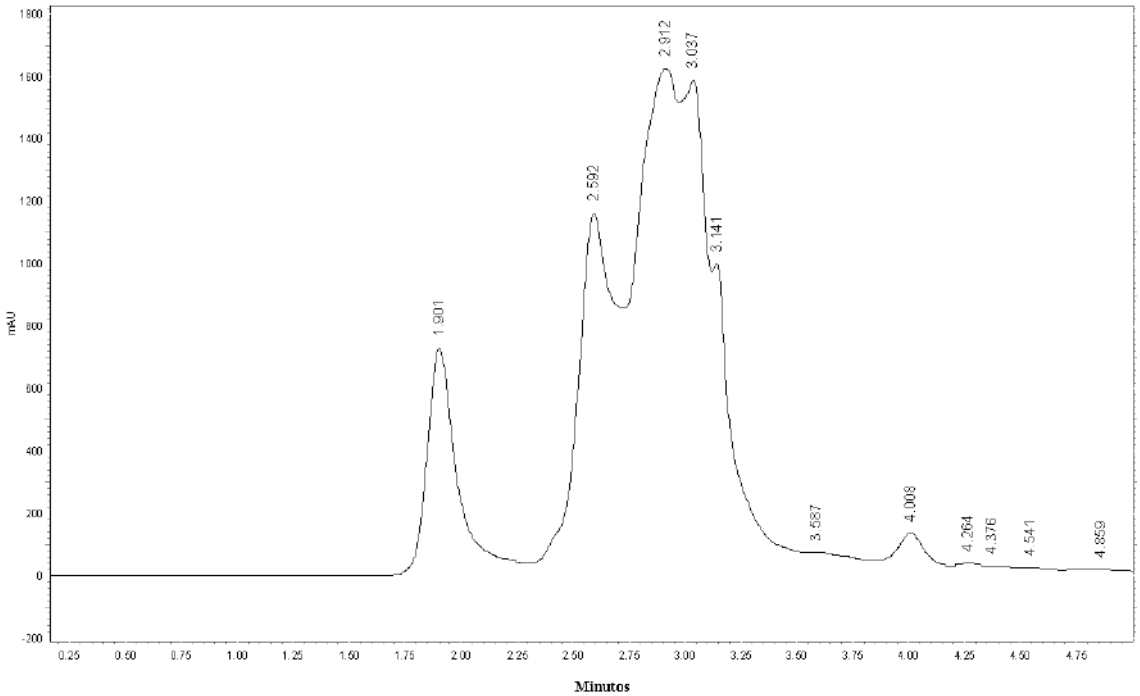
WEI, Y-H; CHU, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by Bacillus subtilis. **Enzyme Microbiology Technology**, v.22, p. 724-728, 1998.

WENNERSTRÖM, H.; LINDMAN, B. Micelles. Physical chemistry of surfactant association. **Physics Reports**, v. 52, p.1-86, 1979.

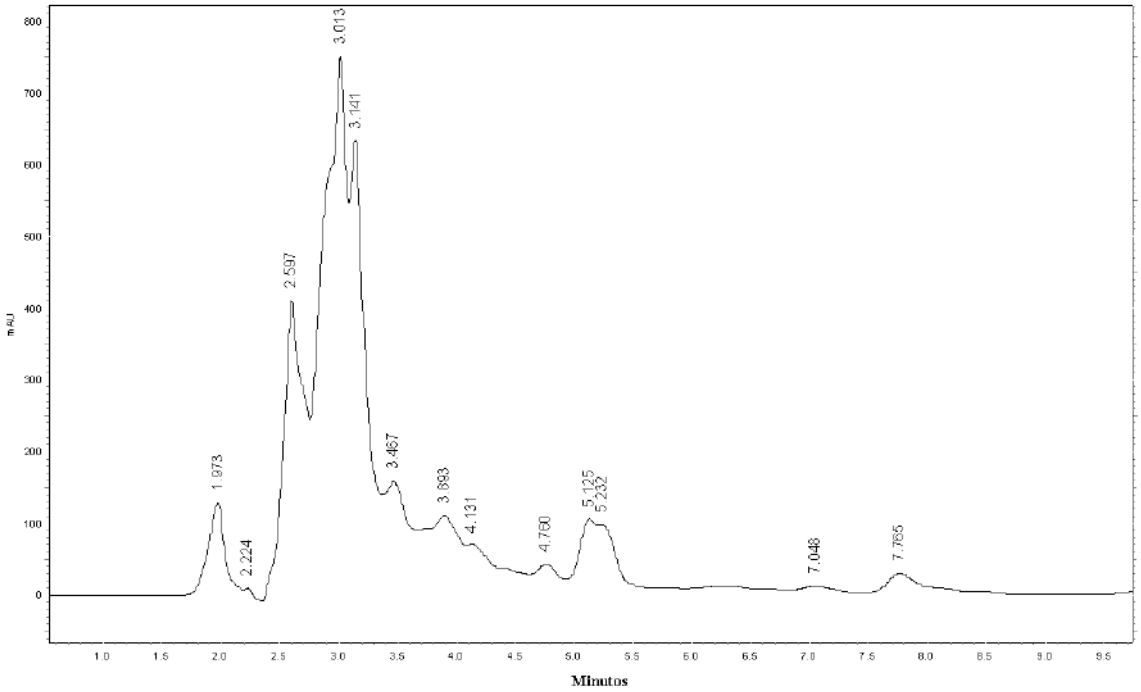
ZHANG, R.; SOMASUNDARAN, P. Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123, p. 213-229, 2006.

ANEXO I

Cromatogramas



Cromatograma referente à análise do biossurfatante purificado por extração com clorofórmio.



Cromatograma referente à análise do biossurfatante purificado por extração com éter etílico.