

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ANA CRISTINA FRANÇA DE BRITO

LILIAN TAQUES DE ALMEIDA

**APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas*
aeruginosa EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2011

ANA CRISTINA FRANÇA DE BRITO
LILIAN TAQUES DE ALMEIDA

**APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas*
aeruginosa EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise Milléo Almeida

PONTA GROSSA

2011



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa



Diretoria de Graduação e Educação Profissional

TERMO DE APROVAÇÃO

APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa*
EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO

por

ANA CRISTINA FRANÇA DE BRITO
LILIAN TAQUES DE ALMEIDA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em dezesseis de novembro de 2011 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Tecnologia em alimentos. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Denise Milléo Almeida
Prof.(a) Orientador(a)

José Mauro Giroto
Membro titular

Ana Cristina França de Brito
Responsável pelos Trabalhos
de Conclusão de Curso

Márcia Regina Carletto
Membro titular

Lilian Taques de Almeida
Responsável pelos Trabalhos
de Conclusão de Curso

Sabrina Ávila Rodrigues
Coordenador (a) do Curso
UTFPR - Campus Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter a oportunidade de concluir mais um objetivo em minha vida. Agradeço também aos meus pais Antônio e Ana por me darem a vida e por ter me educado de uma maneira simples, mas correta.

Ao meu filho querido que amo incondicionalmente, pelos dias e dias que me acompanhou na sala de aula e nos laboratórios.

Ao meu marido que apoiou as minhas decisões e todo o carinho e compreensão que teve comigo nas horas difíceis.

A professora Dr^a Denise Milléo de Almeida, por toda a orientação e conhecimento que nos proporcionou, direcionando para que tudo desse certo ao longo do trabalho.

Ana Cristina França de Brito

Agradeço a Deus, por ter pela minha saúde e principalmente pela oportunidade em concluir mais um objetivo em minha vida.

Agradeço aos meus pais Vanda e Mario, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em minhas escolhas, e dando-me suporte nos momentos mais difíceis de minha vida.

Ao meu irmãozinho querido que amo incondicionalmente, pelo apoio e compreensão.

Em especial a professora Dr^a Denise Milléo de Almeida, por ter nos acolhido em um momento delicado, pela orientação e conhecimento que nos proporcionou, por sua atenção e dedicação que proporcionou ao longo de todo o trabalho.

Lilian Taques de Almeida

RESUMO

BRITO, Ana Cristina França de; Almeida, Lilian Taques de. **Aplicação de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em emulsão de clara de ovo**. 2011. 111 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2011.

O objetivo deste trabalho foi aplicar biosurfactante oriundo de *Pseudomonas aeruginosa* em emulsões de clara de ovo. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: na primeira foi produzido o biosurfactante, compreendendo a seleção de cepas produtoras de biosurfactantes, produção de biomassa e biosurfactante e caracterização do biosurfactante (tensão superficial e índice de emulsificação) e, na segunda etapa houve a aplicação do biosurfactante em emulsão de clara de ovo, caracterizando quanto ao volume da espuma, estabilidade da emulsão (índice de sedimentação e capacidade de retenção de água), sinérese, solubilidade do nitrogênio e pH. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) apresentaram biosurfactante com maiores características de emulsificação. Fermentados com adição de glicerol apresentaram maior produção de biomassa ($4,9 \text{ g.L}^{-1}$) em 96 horas. Maior produtividade de biomassa ($0,055 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e biosurfactante ($0,23 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) em 24 horas, eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (71,7%) em 24 horas e, biosurfactantes com maior índice de emulsificação (92,5%) em 240 horas e redução na tensão superficial (55,8%) em 264 horas, foram observados em fermentados com adição de óleo de soja residual. Fermentados com adição de glicerol e óleo de soja residual apresentaram maior produção de biosurfactante ($14,7 \text{ g.L}^{-1}$) em 264 horas, consumo de açúcar ($11,92 \text{ g.L}^{-1}$) em 96 horas e, eficiência na conversão de açúcar em biomassa (73,4%) em 96 horas. No entanto, fermentados sem adição de glicerol e óleo de soja residual, tiveram em 264 horas maior consumo de açúcar (32,6%), menor produção e produtividade de biomassa ($0,18 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,0006 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente) e menor produtividade de biosurfactante ($0,007 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e, menor produção de biosurfactante ($0,51 \text{ g.L}^{-1}$) em 96 horas. A inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em meio de cultivo com glicerol e óleo de soja promoveu maior produção de biosurfactante. A aplicação desse biosurfactantes pode ser utilizado para ampliar a estabilidade de emulsões com clara de ovo. No entanto, sugere-se o aumento da concentração de biosurfactante na emulsão, para ampliar o volume e estender sua estabilidade.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. biosurfactante. albúmen e emulsão.

ABSTRACT

BRITO, Ana Cristina França de; Almeida, Lilian Taques de. **Aplicação de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em emulsão de clara de ovo**. 2011. 111 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2011.

The objective of this work was apply biosurfactant come from *Pseudomonas aeruginosa* in emulsions of egg white. The study was conducted in two stages: first the biosurfactant was produced, including the selection of biosurfactant-producing strains, biomass and biosurfactant production and characterization of biosurfactant (surface tension and emulsification index) and the second step was the application of biosurfactant emulsion of egg white, featuring on the volume of foam, emulsion stability (sedimentation rate and water holding capacity), syneresis, pH, and solubility of nitrogen. Strains of *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) showed biosurfactant emulsification with more features. Fermented with the addition of glycerol produced more biomass ($4,9 \text{ g.L}^{-1}$) in 96 hours. Increased productivity of biomass ($0,055 \text{ g. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and biosurfactant ($0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) in 24 hours, conversion efficiency of sugar biosurfactant (71.7%) within 24 hours and biosurfactant emulsification with the highest (92,5%) in 240 hours and a reduction in surface tension (55,8%) in 264 hours, were observed with the addition of fermented soy oil residual. Fermented with the addition of glycerol and soybean oil waste produced more biosurfactant ($14,7 \text{ g.L}^{-1}$) in 264 hours, consumption of sugar ($11,92 \text{ g.L}^{-1}$) in 96 hours, and conversion efficiency of sugar in biomass (73,4%) in 96 hours. However, fermented without the addition of glycerol and soybean oil waste, at 264 hours had higher consumption of sugar (32.6%), lower production and biomass productivity ($0,18 \text{ g.L}^{-1}$ and $0,0006 \text{ g. L}^{-1} . \text{h}^{-1}$, respectively) and lower productivity of biosurfactant ($0,007 \text{ g.L}^{-1} . \text{h}^{-1}$), and lower production of biosurfactant ($0,51 \text{ g.L}^{-1}$) in 96 hours. The inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) in culture medium with glycerol and soybean oil promoted increased production of biosurfactant. The application of this biosurfactant can be used to increase the stability of emulsions with egg white. However, it is suggested to increase the concentration of biosurfactant in the emulsion, the volume to expand and extend its stability.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. biosurfactant. albumen and emulsion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química dos mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos.....	21
Figura 2	Biossíntese de biosurfactantes.....	25
Figura 3	Estabilidade de emulsões alimentícias.....	28
Figura 4	Principais funções dos emulsificantes.....	30
Figura 5	Estrutura do ovo.....	31
Figura 6	Biomassa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) após centrifugação.....	41
Figura 7	Fermentado com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), incubados a 30°C em 200 rpm por 264 horas.....	42
Figura 8	Determinação da tensão superficial do biosurfactante pelo método do peso da gota.....	43
Figura 9	Determinação de açúcar total pelo método fenol sulfúrico.....	45
Figura 10	Redução da tensão superficial por biosurfactante produzido por cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UPEDA), pelo método da gota, em óleo de motor 40.....	50
Figura 11	Superfície de resposta da produção (a) e produtividade (b) de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	54
Figura 12	Superfície de resposta da produção e produtividade de biosurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	58
Figura 13	Superfície de resposta da concentração de açúcar durante o período de fermentação, com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), adicionado de glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	61
Figura 14	Superfície de resposta da eficiência de conversão de açúcar em biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	64

Figura 15	Superfície de resposta da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	66
Figura 16	Superfície de resposta da tensão superficial de biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	68
Figura 17	Superfície de resposta do volume da espuma entre os tratamentos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	74
Figura 18	Superfície de resposta da estabilidade da emulsão sobre o índice de sedimentação em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	76
Figura 19	Superfície de resposta da estabilidade da emulsão sobre a capacidade de retenção de água em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	77
Figura 20	Superfície de resposta da sinérese em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	78
Figura 21	Superfície de resposta da solubilidade do nitrogênio em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	80
Figura 22	Superfície de resposta do ph em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	81
Gráfico 1	Curva para determinação da concentração de açúcar total.....	45
Gráfico 2	Evolução da produção de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	51
Gráfico 3	Evolução da produtividade de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	53
Gráfico 4	Evolução da produção de biosurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, com diferentes concentrações.....	55
Gráfico 5	Evolução da produtividade de biosurfactante por <i>Pseudomonas</i>	

	<i>aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	57
Gráfico 6	Evolução da concentração de açúcar em fermentado com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), adicionado de glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	59
Gráfico 7	Evolução da concentração de açúcar por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	60
Gráfico 8	Velocidade volumétrica de consumo de açúcar por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	62
Gráfico 9	Evolução da eficiência de conversão de açúcar em biomassa (ECABM), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	63
Gráfico 10	Evolução da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (ECABS), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	65
Gráfico 11	Tensão superficial de biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	67
Gráfico 12	Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações nos tempos de zero, 24, 96, 240 e 264 horas.....	69
Gráfico 13	Volume da espuma entre os tempos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	73
Gráfico 14	Estabilidade da emulsão sobre o índice de sedimentação em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	75
Gráfico 15	Estabilidade da emulsão – capacidade de retenção de água em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	76
Gráfico 16	Sinérese em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	78

Gráfico 17	Solubilidade de nitrogênio em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	79
Gráfico 18	Potencial hidrogeniônico (pH) em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	81

LISTA DE TABELAS

Quadro 1	Classificação dos ovos.....	32
Tabela 1	Planejamento experimental fatorial 2 ²	40
Tabela 2	Planejamento fatorial 2 ² com três pontos centrais.....	46
Tabela 3 A	Análise de variância aplicada à média dos valores de produção de biomassa em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	100
Tabela 4 A	Análise de variância aplicada à média dos valores de produtividade de biomassa em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	100
Tabela 5	Produção de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	52
Tabela 6	Produtividade de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	53
Tabela 7 A	Análise de variância aplicada à média dos valores de produção de biosurfactante em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	101
Tabela 8 A	Análise de variância aplicada à média dos valores de produtividade de biosurfactante em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	101
Tabela 9	Produção de biosurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	56
Tabela 10	Produtividade de biosurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	57
Tabela 11 A	Análise de variância aplicada à média dos valores da concentração de açúcar (CAÇ) por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	102
Tabela 12	Concentração de açúcar (CAÇ) em fermentado com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), adicionado de glicerol e óleo de soja	

	residual, em diferentes concentrações.....	59
Tabela 13 A	Análise de variância aplicada à média dos valores da eficiência de conversão de açúcar em biomassa (ECAÇBM) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações....	102
Tabela 14	Eficiência de conversão de açúcar em biomassa (ECABM), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	63
Tabela 15 A	Análise de variância aplicada à média dos valores da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (ECAÇB) por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	103
Tabela 16	Eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (ECAÇBIOS) por <i>pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	65
Tabela 17 A	Análise de variância aplicada à média dos valores da tensão superficial do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	103
Tabela 18	Tensão superficial de biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações.....	67
Tabela 19 A	Análise de variância aplicada à média dos valores do querosene no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	104
Tabela 20 A	Análise de variância aplicada à média dos valores do tolueno no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	104
Tabela 21 A	Análise de variância aplicada à média dos valores do diesel no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	105
Tabela 22 A	Análise de variância aplicada à média dos valores da gasolina no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por	

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações.....	105
Tabela 23	Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações a zero hora.....	70
Tabela 24	Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações em 24 horas.....	70
Tabela 25	Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações em 96 horas.....	70
Tabela 26	Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações em 240 horas.....	71
Tabela 27	Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações em 264 horas.....	71
Tabela 28 B	Volume da espuma em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	106
Tabela 29	Volume da espuma em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	73
Tabela 30 B	Estabilidade da emulsão sobre o índice de sedimentação entre os tratamentos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	106
Tabela 31 B	Estabilidade da emulsão sobre a capacidade de retenção de água entre os tratamentos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações.....	107
Tabela 32 B	Sinérese em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	107

Tabela 33 B	Solubilidade do nitrogênio em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	108
Tabela 34 B	Potencial hidrogeniônico em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações.....	108
Tabela 35 A	Fator de correção para o método do peso da gota.....	109
Tabela 36 A	Massa de uma gota que se desprende de tubos de diferentes diâmetros.....	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo Geral.....	18
1.1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	SURFACTANTES.....	19
2.2	BIOSURFACTANTES.....	19
2.3	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES..	21
2.3.1	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	23
2.3.2	Biossíntese de Biosurfactantes.....	24
2.4	EMULSÕES.....	27
2.4.1	Espumas Alimentícias.....	28
2.5	EMULSIFICANTES.....	29
2.5.1	Funções dos Emulsificantes.....	29
2.6	OVO.....	31
2.6.1	Albúmen.....	32
2.6.2	Gema.....	33
2.6.3	Qualidade dos Ovos.....	34
2.7	FATORES QUE AFETAM O VOLUME E A ESTABILIDADE DA CLARA DO OVO NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DA ESPUMA.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	MATERIAIS.....	38
3.2	MÉTODOS.....	38
3.2.1	Seleção de Cepas Produtoras De Biosurfactantes.....	38
3.2.2	Produção de Biomassa.....	39
3.2.3	Produção e Purificação do Biosurfactate.....	41
3.2.4	Determinação da Tensão Superficial do Biosurfactante.....	42
3.2.5	Determinação do Índice de Emulsificação do Biosurfactante.....	44
3.2.6	Determinação da Concentração de Açúcar Total de Fermentado com <i>Pseudomonas</i>	44
3.3	EMULSÃO DA CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE.....	46
3.3.1	Produção e Caracterização da Emulsão da Clara de Ovo com Biosurfactante.....	46
3.3.2	Volume da Espuma.....	46
3.3.3	Estabilidade da Emulsão.....	47
3.3.4	Sinérese.....	48
3.3.5	Determinação da Solubilidade do Nitrogênio.....	48
3.3.6	Potencial Hidrogeniônico.....	49
3.4	ANÁLISE DOS DADOS.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES	50
4.2	PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UPEDA 741).....	50
4.3	PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE BIOSURFACTANTE.....	54
4.4	AÇÚCAR TOTAL.....	58

4.4.1	Concentração de Açúcar Total e Velocidade Volumétrica de Consumo de Açúcar em Meio de Cultivo com <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> (UFPEDA 741).....	58
4.4.2	Eficiência de Conversão de Açúcar em Biomassa.....	62
4.4.3	Eficiência de Conversão de Açúcar em Biosurfactante.....	64
4.5	TENSÃO SUPERFICIAL.....	66
4.6	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO.....	68
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DA CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE.....	72
4.7.1	Volume da Espuma.....	72
4.7.2	Estabilidade da Emulsão: Índice de Sedimentação (IS).....	74
4.7.3	Estabilidade da Emulsão: Capacidade de Retenção de Água (CRA)....	76
4.7.4	Sinérese.....	77
4.7.5	Solubilidade do Nitrogênio.....	79
4.7.6	Potencial Hidrogeniônico (PH).....	80
5	CONCLUSÃO.....	82
	CONSIDERAÇÕES.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APENDICE A - Análise de Variância.....	101
	APENDICE B – Tabelas.....	107
	ANEXO A – Tabelas.....	110

1 INTRODUÇÃO

Os emulsificantes são definidos pela legislação brasileira como substâncias que tornam possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme, de duas ou mais fases imiscíveis nos alimentos, ou seja, alteram as propriedades de alguns alimentos para que possam ser misturados (BRASIL, 1997).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biosurfactantes e, consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (GEORGIOUS et al.,1992).

Grande variedade de microrganismos produz biosurfactantes. No entanto, o tipo, a quantidade e qualidade são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons como fósforo (P), nitrogênio (N), magnésio (Mg), ferro (Fe) e oxigênio (O₂) no meio de cultura e condições de cultivo (GEORGIOUS et al.,1992). Entre os microrganismos produtores estão as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Candida bombicol*, *Corynebacterium insidiosum* (MULLIGAN et al., 2001).

O processo de produção de biosurfactantes é a chave da viabilidade econômica. Estima-se que a matéria-prima representa cerca de 10% a 30% do custo total na produção de biosurfactante. Os surfactantes como alquil-poliglicosídeo chegam a custar em torno de US\$ 1 a 3, por quilograma (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Os biosurfactantes formam um grupo heterogêneo de moléculas, com propriedades tensoativas e emulsificantes. Suas principais características são baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, produção por meio de substratos renováveis, estáveis em diferentes temperaturas e pH (KOSARIC, 1996).

A síntese de biosurfactante por alguns microrganismos ocorre durante a fase logarítmica do desenvolvimento celular e, são imiscíveis em água. Devido suas propriedades podem ser usados no processamento de alimentos (emulsificantes e umectantes), na indústria de cosméticos, fármacos e detergentes (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). O processo acontece em decorrência da habilidade de reduzirem a tensão superficial, pelo remanejamento molecular, que aumenta a área superficial proporcionando maior biodisponibilidade e biodegradabilidade no meio inserido (SHAFI; KHANNA, 1995).

Os emulsificantes vêm sendo utilizados em vários produtos como panificação, para produção de emulsões, formação de complexos com o amido e a interação com proteínas. Em

confeitaria, a principal aplicação está na aeração de massas de bolo (PAVANELLI, CICHELO, PALMA, 2000).

Alimentos preparados com a clara de ovo são baseados nas propriedades espumantes desta, resultantes da capacidade que as proteínas do albúmen possuem de encapsular e reter o ar com facilidade, considerada como uma característica extremamente desejável na indústria de alimentos (LOMAKINA; MÍKOVÁ, 2006).

Bolos, pães, sorvetes e doces são exemplos típicos de produtos aerados da indústria de alimentos. Os fabricantes demonstram cada vez mais interesse em explorar a inovação e a versatilidade das bolhas como ingredientes alimentares. As bolhas criam condições no alimento que facilitam a dispersão do sabor (LAU; DICKINSON, 2006) e oferecem ao consumidor alternativa mais leve em termos calóricos (BARIGOU, 2009).

Considerando a importância das propriedades espumantes da clara de ovo para a tecnologia de alimentos, há necessidade de se buscar mecanismos que melhorem a capacidade de formação e estabilização da espuma.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Aplicar biosurfactante oriundo de *Pseudomonas aeruginosa* e, aplicar em emulsões de clara de ovo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar cepas de *Pseudomonas aeruginosas* produtoras de biosurfactantes;
- b) Verificar a produção e produtividade de biomassa e biosurfactante no processo fermentativo;
- c) Verificar a velocidade de transformação de substrato (fontes de carbono) em biomassa e biosurfactante;
- d) Caracterizar o bisurfactante quanto à tensão superficial;
- e) Índice de emulsificação;
- f) Caracterizar a emulsão de clara de ovo com biosurfactante quanto ao volume, estabilidade da emulsão, sinerese, solubilidade de nitrogênio e pH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos anfipáticos formados por moléculas com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Essas moléculas anfífilas reduzem a tensão superficial e interfacial de fluidos imiscíveis, aumentando sua solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou orgânicos (SINGH et al., 2007). São classificados em aniônicos, catiônicos e não iônicos, de acordo com a ionização do seu grupo polar. Os grupos hidrofílicos em surfactantes catiônicos tornam-se carregados negativamente em solução aquosa como, por exemplo, o brometo de cetiltrimetilamônio (PEREIRA, SILVA, 2009).

As características dos surfactantes conferem ação detergente, emulsificante e formação e estabilização de espumas (DESAI, BANAT, 1997). A eficiência é determinada pela capacidade de redução da tensão superficial, ou seja, a medida de energia livre da superfície, por unidade de área necessária para que uma molécula do interior do líquido chegue à superfície. Devido à presença de surfactantes a necessidade de energia será menor para trazer uma molécula do interior do líquido até sua superfície. (MULLIGAN, 2005).

Os surfactantes são utilizados nas indústrias químicas como em óleo de motor em automóveis, produtos farmacêuticos, limpeza e de refino de petróleo. A aplicação de surfactantes é extensa como em áreas de tecnologia, impressão eletrônica, gravação magnética, microeletrônica, biotecnologia e pesquisa. No entanto, sua aplicação pode produzir poluição ambiental e uma série de problemas nas plantas de tratamento de efluentes (PEREIRA, SILVA, 2009).

2.2 BIOSURFACTANTES

Substâncias de origem microbiana com propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e/ou possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biosurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias e fungos (LIMA et al., 2007).

Os biosurfactantes formam um grupo heterogêneo de moléculas e apresentam propriedades tensoativas (GEORGIU, 1992), suas principais características são baixa

toxicidade, alta biodegradabilidade, produção por meio de substratos renováveis, estáveis em diferentes temperaturas e pH (KOSARIC, 1996).

Biosurfactantes são subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras. Estes produtos possuem propriedades físico-químicas similares às dos surfactantes sintéticos, no entanto, oferecem vantagens sobre os químicos como maior seletividade e atividade específica sob condições extremas, entre eles a salinidade que ocorre naturalmente no solo, o que os fazem aceitáveis sob o ponto de vista ecológico e social (BANAT et al. 1995; DESAI, BANAT, 1997; KOSARIC, 2001).

Os biosurfactantes são mais eficazes e eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes e, apresentam propriedades como a maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Sua utilização está relacionada à suas propriedades com grande variedade de aplicações, aliada à crescente importância da aceitabilidade ambiental, devido sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade, tem aumentado a sua demanda. No entanto, sua entrada no mercado em larga escala ainda é limitada, devido ao seu alto custo de produção quando comparados aos sintéticos (MARQUÉS et al., 2009).

De acordo com as características apresentam capacidade de emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água. Isto se deve ao aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos presentes no meio, tornando a sua utilização eficiente na biorremediação de solos e mananciais contaminados (CRAPEZ, 2002).

O biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* é composto por uma mistura de homólogos de ramnolipídeos, sua composição depende de vários fatores, como a cepa, condições e meios de cultura e a idade da cultura. Os ramnolipídeos são considerados metabolitos secundários, já que sua síntese coincide com o início da fase estacionária do crescimento da bactéria (DEZIEL et al., 2000).

A razão da síntese dos biosurfactantes pelas bactérias não esta bem esclarecida, no entanto, estes compostos estão relacionados à captação de substratos hidrofóbicos (DAS, UKHERJEE, 2005), e ao aumento da difusão de substâncias insolúveis para o interior da célula (MULLIGAN, 2005; CAMEOTRA, MAKKAR, 1998). A produção de ramnolipídeos pode também estar relacionada a fatores de virulência, regulada pelo sistema genético (LEE et al., 2004; SMITH, IGLEWSKI, 2003).

Os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* estão entre os biosurfactantes mais estudados (LEE et al., 2004) e representam uma das mais importantes classes de surfactantes microbianos, pois possuem excelentes propriedades tensoativas (Figura 1).

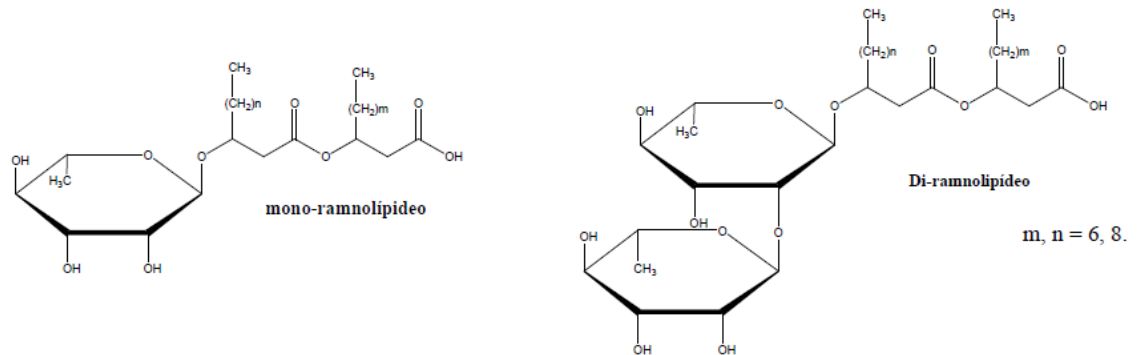


Figura 1 - Estrutura química dos mono-raminolípeos e di-raminolípeos
Fonte: SOBERÓN-CHÁVEZ et al. (2005)

Podem ser produzidos em altas concentrações (em fermentação submersa, até 100 g/L em média) apresentando assim bom potencial na exploração comercial. Outra vantagem dos ramnolípeos deve-se a sua produção a partir de fontes de custo relativamente baixo, substratos hidrofílicos e hidrofóbicos, como carboidratos, óleos vegetais e hidrocarbonetos (HOLMBERG, 2001) ou a partir de efluentes de indústrias de alimentos (NITSCHKE et al., 2005b; MAKKAR, CAMEOTRA, 2002).

2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES

Os biosurfactantes são produzidos por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos e, encontrados na natureza (HEALY et al., 1996).

Os primeiros estudos com a utilização de biosurfactantes foram relatados em 1949, por Jarvis e Johnson, eles detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um ramnolípeo. Em 1968, Arima descobriu a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis* (JARVIS, 1949), que foi denominado surfactina por ter grande atividade superficial (KAKINUMA, 1969). Posteriormente, foi relatada a produção de biosurfactante em meios hidrofóbicos, o que levou a estudos de sua aplicação em diversos tratamentos primeiramente na área ambiental (ITOH, 1971; PRINCE, 1993; VAN DYKE, 1991).

De acordo com Georgiou; Lin; Sharma (1992), uma numerosa variedade de microrganismo é produtor de biosurfactante. A qualidade do biosurfactante pode ser

influenciada pelo substrato, concentração de íons no meio de cultura utilizados, além das condições de cultivo.

Entre as bactérias produtoras de surfactantes estão a *Pseudomonas aeruginosa* (monodi-ramnolipídeos), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos glicolipídeos), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose) (CHRISTOFI, IVSHINA, 2002).

Biosurfactante produzido por *Acinetobacter sp* e *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, possuem excelente capacidade de emulsão (RUBINOVITZ et al., 1982). *C. bombicola* produzem biosurfactantes com eficiência na solubilização de carvão⁴³. *Alcanivorax sp*, *Arthrobacter sp*, *Bacillus sp*, *Rhodococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Thiobacillus sp*, *Corynebacterium sp*, *Clostridium sp*, *Klebsiella sp*; *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus aureus*, *R. Erythropolis* e *Lactobacillus* também são capazes de produzirem biosurfactantes (LANG, RAHMAN et al., 2002).

A surfactina é o principal surfactante produzido por cepas de *Bacillus subtilis* (COSTA, 2005; ARIMA; KAKINUMA; TAMURA; GERMAN PATENT 1968; KOWALL; VATER; KLUGE; STEIN; FRANKE; ZIESSOW, 1998), suas características químicas e propriedades funcionais permitem demonstrar o grande potencial dessa substância para aplicação em diversos segmentos industriais. Pesquisas têm demonstrado que surfactina é bastante estável, quando submetida a diversas condições. O *Bacillus subtilis*, utilizando solução de 1,0 mg/mL de produto bruto em água, mostrou capacidade de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis como óleos de buriti (*Mauria flexuosa*), maracujá (*Passiflora alata*), cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), babaçu (*Attalea speciosa*), linhaça (*Linum usitatissimum*), castanha do Pará (*Bertholetia excelsa*), palma (*Elaeis guineensis dura*), soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annus*), canola (*Brassica napus*) e oliva (*Olea europaca*) (COSTA, 2005).

Bacillus sp produzem biosurfactantes estáveis em concentrações de NaCl de 2 a 3% (Lin; Goursaud; Kramer; Georgiou; Sharma, 1990) e a cepa de *Bacillus subtilis* C9 possui estabilidade e manutenção de propriedades emulsificantes a limites variados de temperaturas (20-100 °C por 1 hora), pH (5,0 a 9,5) e concentrações salinas de 1.000 mM de NaCl e 10 mM de CaCl₂ (KIM; YOON; LEE; SUH; OH; KATSURAGI, TANI, 1997).

Na indústria de alimentos o biosurfactante produzido por *Candida utilis* é aplicado como emulsificante em molhos para salada (SHEPHERD; ROCKEY; SUTHERLAND; ROLLER, 1995).

Leveduras das espécies de *Candida* e *Yarrowia* têm sido empregadas na produção de biosurfactantes. Outras espécies também são citadas como *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* (monoproteína), *Wicherhamiella domercqiae*, *Candida bombicola*, *Torulopsis petrophilum* e *Candida bogorienses* (soforolipídeos), *Torulopsis sp* (soforolipídeos); *Candida tropicalis* e *Candida sp* (liposan e fofolipídeos) (CHRISTOFI, IVSHINA, 2002).

Leveduras *Candida utilis*, *Candida valida*, *Hansenula anomala*, *Rhodospiridium diobovatum* e *Rhodotorula graminis*, foram identificadas como bons produtores de bioemulsificantes extracelulares, ou seja, que tem função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante. Obtendo um resultado mais satisfatório de atividade estabilizante quando utilizado a goma arábica e a carboximetilcelulose (SHEPHERD et al., 1995).

2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à ordem Pseudomonadales, família Pseudomonaceae, sendo um gênero importante no âmbito clínico e ambiental (ANZAI et. al. 2000). A maioria são microrganismos de vida livre, pode infectar diversas espécies de plantas e animais, apenas algumas espécies são patogênicas para o ser humano. O gênero *Pseudomonas* inclui espécies fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) e não fluorescentes (*P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*) (PALLERONI, 1998).

As espécies *P. aeruginosa* tem a forma de bastonetes curvados, podem ser observadas isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, não esporulado e aeróbico estrito (exceto em presença de nitrato, circunstância em que cresce em condições anaeróbias). Mede de 1,5 a 3µm de comprimentos e 0,5 a 0,8µm de largura. É móvel, mas dependendo da cepa pode variar o número de flagelos e sua posição na célula (DOGGET, 1979).

Pseudomonas aeruginosa pode crescer em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, em alguns casos, cresce anaerobicamente e em algumas circunstâncias usa o nitrato como fonte de elétrons (DOGGET, 1979). Produzem pigmentos fluorescentes difusíveis, a pioverdina e a piocianina. Algumas cepas podem produzir pigmentos vermelho-escuros ou pretos, que recebem o nome de piorrubinaepiomelanina. São pouco exigentes do ponto de vista nutricional, e podem desenvolver em temperaturas entre 37°C e 42°C e não toleram pH ácido (POLLACK, 2000).

Trabalhos desenvolvidos por Jarvis e Johnson (1949) mostraram que *P.aeruginosa* cultivada em meio contendo glicerol, produziu glicolípido, este composto por uma porção hidrofóbica de ácido graxo e uma porção hidrofílica composta por uma ou duas ramnoses.

2.3.2 Biossíntese de Biosurfactantes

A biossíntese dos ramnolípideos é um processo que envolve várias enzimas. Uma sequência de três reações compõe a biossíntese de ramnolípideos (Figura 2).

A primeira reação envolve a síntese de um ácido graxo, onde a enzima responsável pela síntese dos ácidos graxos é ramnosiltransferase A (RhIA E.C. 2.4.1.159). Na segunda reação é catalisada pela ramnosiltransferase B (RhIB), que utiliza a timidina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-ramnose) como doadora e o β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, (HAA) como receptor, produzindo assim o monoramnolípido. A terceira reação envolve uma ramnosiltransferase C (RhIC), responsável pela síntese do diramnolípido (SOBERÓN-CHÁVEZ et.al., 2005).

Os genes que codificam a biossíntese, também regulam a indução da RhIB que estão organizados em um grupo operon denominado *rhlABRI*, localizados no cromossomo da *Pseudomona aeruginosa*. Os genes envolvidos na codificação da RhIC, não estão caracterizados devidamente (SOBERÓN-CHÁVEZ et.al., 2005).

A timidina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-ramnose) é sintetizada a partir da porção açúcar do biosurfactante, que consistem na conversão da D-glucose-1-fosfato via dTDP-glucose, dTDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucose, e dTDP-4-ceto-6-deoxi-L-manose (Figura 2). Essas conversões são catalisadas nas *P. aeruginosa* pelo grupo gênico *rml* agrupado em um operon (*rml ABCD*) (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005).

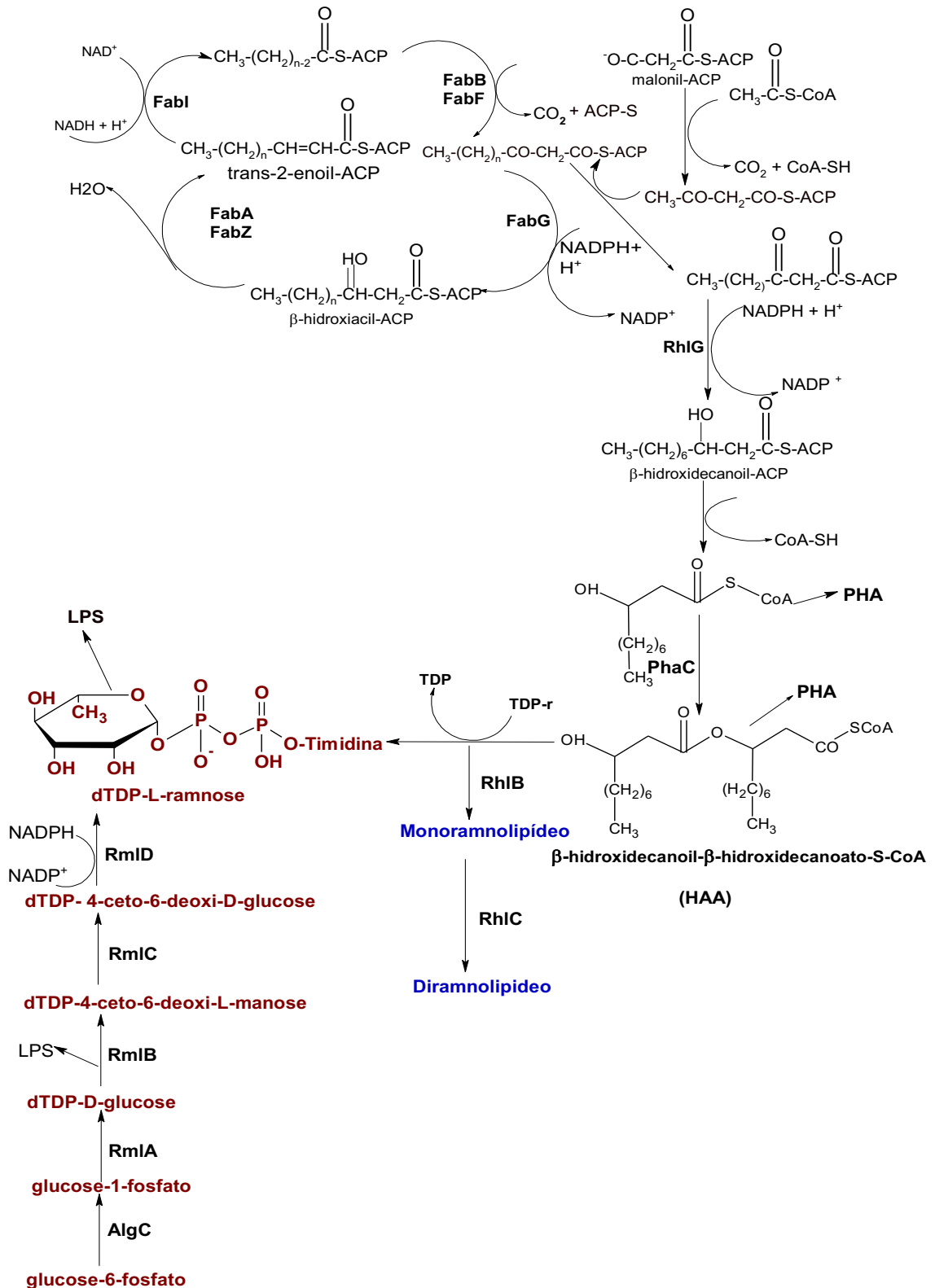


FIGURA 2 - Biossíntese de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*
 Fonte - Adaptado de Campos-Garcia et al., (1998), Maier e Sobéron-Chávez (2000)

A biossíntese dos ácidos graxos de *P. aeruginosa* em nível da redução aceto-amil, entra em divergência com a síntese dos ácidos graxos dos ramnolipídeos. Desta forma, a enzima

precursora dos ácidos graxos dos ramnolipídeos é chamada RhIG (β -cetoacil-ACP redutase) e o doador de elétrons NADPH. A RhIG está envolvida na produção de ramnolipídeos e também na síntese dos polihidroxicanoatos (PHAs). Bredenbruch et al. (2005), reportaram que a RhIG pode estar envolvida na produção da proteína transportadora de grupo acila- (ACP), precursora dos ácidos graxos e na síntese de homoserinalactonas (HAQs) (CAMPOS-GARCÍA et al., 1998).

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são compostos de reserva, sendo acondicionados na forma de grânulos intracelulares por inúmeras bactérias. Em *P. aeruginosa* estes grânulos são localizados na forma de polímeros de β -hidroxidecanoato. O ácido mais facilmente encontrado em PHAs é o β -hidroxidecanoato (C_{10}), e é também o ácido graxo mais encontrado nos ramnolipídeos e nos HAAs. Os PHAs são sintetizados pela polimerização do β -hidroxiácidos catalisados pela PhaC (polihidroxicanoatossintetases), com a coenzima-A ligada a ácidos graxos como substratos (CAMPOS-GARCÍA et al., 1998)

A síntese do β -hidroxidecanoato, é catalisada pela acetil-CoA-ACP transacetilase (FabH) que requer o grupo acetil do acetil-CoA e a proteína condutora malonil-ACP para compor o acetoacetil-ACP. Na próxima etapa ocorre a condensação do malonil-ACP com acil-ACP catalisadas pelas FabB e FabF (β -cetoacil-ACP-sintase I e II), respectivamente. O segundo passo, o β -ceto-éster formado no primeiro passo, é reduzido para β -hidroxiacil-ACP. Essa reação é catalisada pela FabG (β -cetoacil-ACP redutase) e o doador de elétrons NADPH. O terceiro passo do ciclo é catalisado por uma FabA ou FabZ (β -hidroxiacil-ACP desidratase). O quarto e último passo é a diminuição do trans-2-enoil-ACP para acil-ACP, pela ação da FabI (enoil-ACP redutase), de novo, o NADPH é o doador de elétrons (CAMPOS-GARCÍA et al., 1998).

A cada ciclo, o composto resultante é alongado em uma unidade acila. Quando o β -hidroxidecanoato é finalmente sintetizado ele é reduzido pela ação da RhIG, de forma similar à reação catalisada pela FabG na produção de β -hidroxiácidos (Figura 2).

A β -cetoacil-CoA redutase (PhaB) é responsável pela fase de redução na produção dos β -hidroxiácidos. O β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (HAA) formado servirá então como substrato para produção do monoramnolipídeo pela ação da RhIB, responsável pela transferência dTDP-ramnose para o HAA. O monoramnolipídeo produzido pode ainda ser acrescentado de mais uma ramnose pela ação catalítica da RhIC, gerando o diramnolipídeo (SANTOS, 2003).

2.4 EMULSÕES

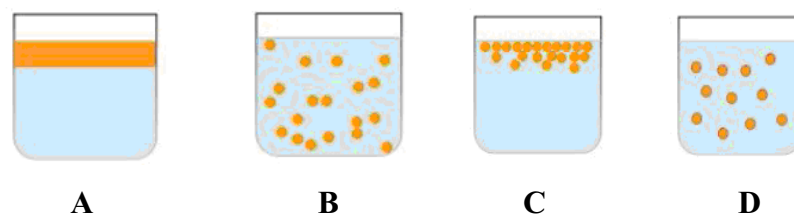
As emulsões podem ser definidas como misturas de dois líquidos imiscíveis, sendo um deles (chamada de fase dispersa) que se encontra no formato de finos glóbulos que fica no meio do outro líquido (chamada de fase contínua) (MCCLEMENTS, 2005). Em alimentos as emulsões são consideradas de alta complexidade, podendo ser utilizadas na fase aquosa e na fase oleosa pode ser complementada com adição de componentes chamados de membrana-ativos com proteínas, fosfolipídeos, monoglicerídeos e outros surfatantes (NUSSINOVITCH, 1997; ARAÚJO, 2004).

A emulsificação contém dois passos: o primeiro a deformação e diminuição das gotículas da fase dispersa, com isso a área de contato específica da emulsão é aumentada; e o segundo a estabilização da interface óleo/água por um emulsificante com intenção de prevenir a coalescência (MCCLEMENTS, 2005).

A estabilidade da emulsão acontece devido à energia livre presente na formação da mesma, que é normalmente positiva e por este motivo as emulsões são termodinamicamente instáveis, então se faz necessário a incorporação de proteínas e surfactantes de baixa massa molecular para conferir a emulsificação evitando coalescência e assim promovendo maior vida-de-prateleira (DICKINSON, 2003).

Por serem instáveis, as emulsões não conseguem se formar espontaneamente, sendo preciso fornecer energia por meio da agitação para serem formadas. As emulsões têm uma tendência a voltar para o estado estável com o passar do tempo (LOBO, SVEREIKKA, 2003). Para evitar esse problema grande parte das emulsões é preparada na presença de emulsificantes (LOBO, 2000).

Os emulsificantes agem aumentando a sua estabilidade cinética fazendo com que fiquem mais estáveis e homogêneas (Figura 3).



Nota - A figura 3 apresenta cinco fases: (A) Dois líquidos imiscíveis separados em duas fases; (B) Emulsão da fase ii dispersa na fase i; (C) Emulsão instável progressivamente retorna ao seu estado inicial de fases separadas; (D) Surfatante se posiciona na interface entre as fases i e ii, estabilizando a emulsão.

FIGURA 3 - Estabilidade de emulsões alimentícias
FONTE: Mcclements (2005)

Segundo Izquierdo et al. (2002), a estabilidade de uma emulsão depende obrigatoriamente de três processos como sedimentação, floculação e quebra da emulsão devido à coalescência das gotículas dispersas. O pH, temperatura, força iônica, concentração de proteína também são fatores que afetam as propriedades físicas das emulsões (GUZEY, MCCLEMENTS, 2006).

Quando duas gotas se fundem formando uma gota maior, ocorre a coalescência. Assim envolve a ruptura do filme superficial de cada gota independentemente das outras, é um processo irreversível, que pode resultar na quebra da emulsão (VAN AKEN; BLIJDENSTEIN; HOTRUM, 2003).

A separação de fases pode ocorrer em segundos ou demorar dias, isso dependerá da formulação utilizada na emulsão. Para que haja aumento na estabilidade cinética das emulsões, um emulsificante pode ser adicionado, formando um filme adsorvido em volta das gotas dispersas, que previnem a floculação e a coalescência (MCCLEMENTS, 2005).

Para diversas aplicações industriais, a estabilidade da emulsão não é o único atributo a ser considerado, em algumas circunstâncias a desestabilização controlada da emulsão é provocada para promover textura desejável e qualidade no produto final, como em cremes batidos e sorvetes (DARLING; BIRKETT, 1986).

2.4. 1 Espumas Alimentícias

Os surfactantes têm também um papel importante na estabilização das espumas líquidas, pois as moléculas do surfactante que estão à superfície fazem diminuir a tensão superficial da água. A água pode assim distribuir-se por películas finas, ao invés de procurar concentrar-se num volume o mais compacto possível de forma a minimizar a área de contato com o ar (CAPITANI, 2004).

As propriedades espumantes abrangem a capacidade de formação de uma dispersão ar em água, que se deve à expansão do volume da dispersão promovida por um emulsificante, com incorporação de ar através das técnicas de batimento, agitação ou aeração (CAPITANI, 2004). Na indústria alimentícia, a formação de espuma é aplicada em produtos como merengues, mousses e cervejas (SGARBIERI, 1996; WILDE; CLARK, 1996) e também na produção de sorvetes (NOBRE et al. 2006; SOLER; VEIGA, 2001).

Segundo Davanço (2006), a estabilidade da emulsão é influenciada pela morfologia do filme, ou seja, pelas características da fase contínua (viscosidade, pH, força iônica, entre outras) e da fase dispersa (tamanho e densidade da partícula lipídica).

2.5 EMULSIFICANTES

Segundo Portaria nº 540 de 1997 (BRASIL, 1997), emulsionante/emulsificante são substâncias que tornam possíveis a formação ou manutenção de uma mistura uniforme, com duas ou mais fases imiscíveis no alimento.

A emulsão é um sistema heterogêneo constituído de um líquido imiscível, completamente difuso em outro, na forma de gotículas com diâmetros superiores a 0,1 micra. Para a estabilidade das gotículas dispersas em fase contínua se faz necessário o uso de energia (WALSTRA, 1996).

Emulsões em alimentos apresentam duas fases, uma com óleo e outra com água, sendo a fase contínua a água e a dispersa o óleo. Os emulsificantes são agentes ativos de superfície e compostos anfifílicos com peso molecular médio, por esta razão os emulsificantes são absorvidos na interface entre o óleo e a água, reduzindo a tensão superficial e a energia necessária para a formação da emulsão (ARAÚJO, 1999).

Os emulsificantes mais comumente utilizados pela indústria de alimentos são proteínas da soja, do ovo, a caseína, fosfolipídeos e pequenas moléculas surfactantes (polissorbatos, monoacilglicerol, lectinas com peso molecular na faixa de 500 – 1300) (ARAÚJO, 1999).

Emulsificantes, não são necessários apenas para a formação de uma emulsão, mas também para prover a estabilidade da emulsão formada. É importante ressaltar a diferença entre estas funções, pois, alguns produtos são apropriados para a formação de gotículas pequenas, entretanto, não proporcionam estabilidade contra a coalescência. Um emulsificante de boa qualidade deve persistir com estas características, sob condições variadas de pH, energia iônica elevada, solventes fracos e altas temperaturas (WALSTRA, 1996).

2.5.1 Funções dos Emulsificantes

Uma das principais funções dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados. Outro atributo é a formação de complexos com amido, para prolongar a

maciez, pela redução da retrogradação do amido e a interação com proteínas (FOOD INGREDIENTS BRASIL N° 7- 2009).

Em confeitaria, a principal aplicação dos emulsificantes é na aeração de massas de bolo, que é a propriedade responsável por maior volume (PAVANELLI, CICHELO, PALMA, 2000). Além da diferença no volume que é bem maior do bolo quando preparado com emulsificante apresenta o miolo mais fechado e homogêneo do que em bolo sem adição de emulsificante. Em relação à aparência externa, a diferença entre os dois bolos é significativa, ou seja, a superfície do bolo preparado sem emulsificantes é rugosa, com diversas saliências, enquanto a do bolo com emulsificantes é lisa e homogênea (PAVANELLI, CICHELO, PALMA, 2000).

O mecanismo de ação do processo de aeração com aplicação do biosurfactante está relacionado ao mesmo tempo em que estes se posicionam na interface entre a gordura e a fase aquosa. Os emulsificantes também reduzem a tensão superficial entre a fase aquosa e o ar, permitindo a incorporação de ar em quantidade maior e mais rápida na massa. Quando o ar é introduzido na massa durante o batimento, a proteína decorrida normalmente da clara de ovo sofre um desdobramento, de tal forma que sua porção lipófila fica voltada para a fase gasosa, ou seja, para o interior das bolhas de ar, e sua parte hidrófila continua na fase aquosa. Este filme protéico também atua na formação e estabilização da espuma, juntamente com as moléculas do emulsificante (Figura 4) (PAVANELLI, CICHELO, PALMA, 2000).

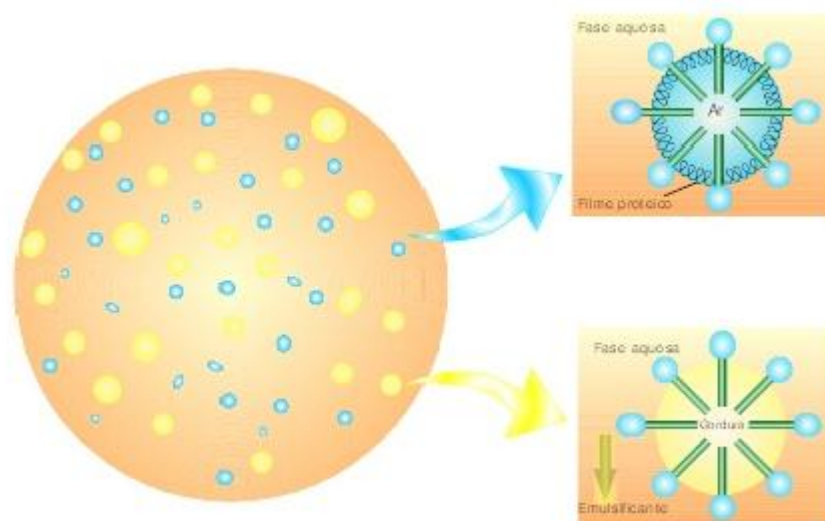


Figura 4 - Mecanismo de ação do processo de aeração
Fonte: (Pavanelli, Cichello, Palma, 2000)

2.6 OVO

Define-se por ovos, ovos de galinha em casca, sendo que os demais são acompanhados da indicação da espécie que procedem (BRASIL, 1997).

O ovo é considerado pela Organização de Saúde (OMS) um alimento rico nutricionalmente, fonte de proteína de alto valor biológico. Sua composição inclui vitaminas A, D, E, K, do complexo B e minerais como ferro, fósforo, manganês, potássio e sódio.

No entanto, para que esse potencial seja utilizado, o ovo precisa ser preservado, pois não é consumido logo após a postura. De acordo com MORENG, AVENS (1990), quanto maior for o período entre a postura do ovo e o seu consumo, menor será a qualidade interna, porque perdem gradualmente a qualidade.

O ovo contém três partes como gema, albúmen e a casca (Figura 5). A proporção entre os componentes é determinada pela linhagem e idade das aves poedeiras (AKABAR et al., 1983). Segundo Brandalize (2001) as concentrações dos componentes do ovo são gema – 32 a 35%, albúmen – 52 a 58% e casca – 9 a 14%. Segundo Torres et al. (2005), os ovos contêm um teor de umidade de 76,77 g/100 g, cinzas de 0,90 g/100 g, lipídeos de 10,54 g/100 g e proteína de 12,90 g/100 g e um valor calórico de 146 kcal.

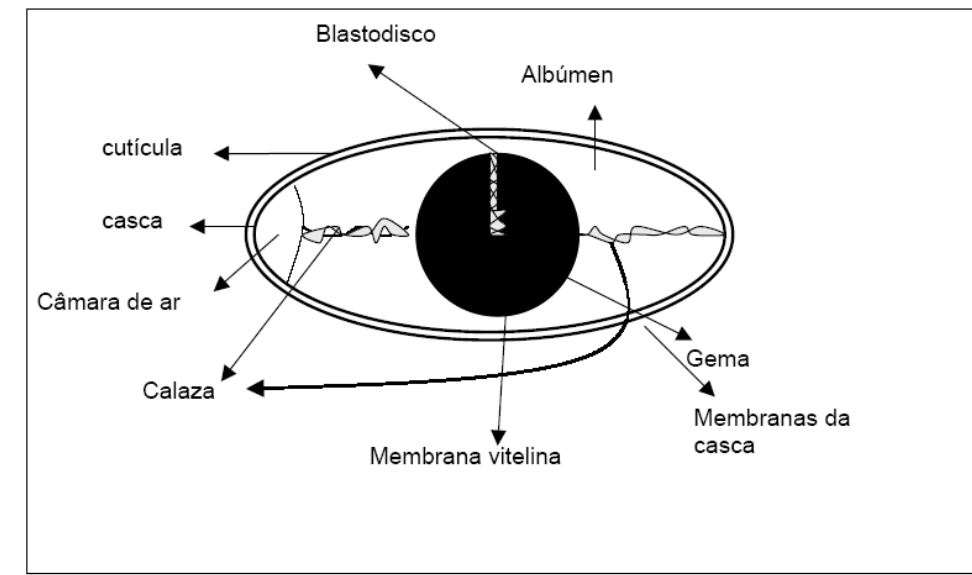


FIGURA 5 - Estrutura do ovo
Fonte: Oliveira (2006)

Os ovos são classificados em grupos, classes e tipos, segundo a coloração da casca, qualidade e peso. A classificação do ovo, segundo a coloração da casca, pode ser definida como: branco (grupo I) ou de cor (grupo II). Fazem parte do grupo I, ovos que apresentam casca com coloração branca ou esbranquiçada, do grupo II, fazem parte os ovos que apresentam casca de coloração avermelhada. O ovo poder ser ordenado nas classes A, B e C em relação a sua qualidade (MAPA, 1965) (Quadro 1).

Casca	Classes		
	A	B	C
Casca	Limpa, íntegra e sem deformação	Limpa, íntegra, ligeiramente deformada e manchada	Limpa, íntegra, com defeitos de textura, contorno e presença de manchas
Câmara de ar	Fixa, com máximo de 4 mm de altura	Fixa, com no máximo de 6 mm de altura	Solta, com no máximo de 10 mm de altura
Clara	Límpida, transparente e com calazas intactas	Límpida, transparente, relativamente consistente e com calazas intactas	Ligeira turvação apresenta-se ligeiramente consistente e com calazas intactas
Gema	Translúcida, consistente, centralizada e sem desenvolvimento do germe	Translúcida, ligeiramente descentralizada e deformada, porém com contorno bem definido e sem desenvolvimento do germe	Descentralizada e deformada, porém com contorno definido e sem desenvolvimento do germe

Quadro 1 – Classificação dos ovos de acordo com a qualidade das classes
Fonte: MAPA (1965)

Segundo BRASIL (1997) o ovo é classificado segundo seu peso em tipo extra com peso mínimo de 60 g por unidade ou 720 g por dúzia; grande com peso mínimo de 55 g por unidade ou 660 g por dúzia; médio com peso mínimo de 50 g por unidade ou 600 g por dúzia; pequeno com peso mínimo de 45 g por unidade ou 540 g por dúzia e industrial com peso abaixo de 45 g por unidade.

2.6.1 Albúmen

O albúmen ou clara do ovo envolve a gema, tendo com função proteção, absorvendo impactos fortes, além de ser fonte nutricional. Possuem diversas camadas, a líquida circundando a gema, a intermediária com aspecto denso e a externa próxima à casca, que contém composição parecida a da camada mais interna (STADELMAN, COTERILL, 1977; ROSE, 1997; SOUZA-SOARES, SIEWERDT, 2005)

A clara de ovo é o maior componente do ovo in natura (DANGARANET et al., 2009), com 58% do peso de um ovo e, têm como composição básica água e proteínas (MINE; D'SILVA, 2008; VACLAVICK; CHRISTIAN, 2008).

Dentre as características do albúmen está à transparência, também deve ser límpido, consistente, denso, com pequena porção fluida. Com o passar do tempo a clara tende a ficar líquida espalhando-se com facilidade, provocando alterações em sua acidez (SARCINELLI et al., 2007). As camadas da clara diferem no grau de viscosidade, alternando de denso para fino. A camada mais densa está aderida à gema enquanto o fino se encontra aderido à casca (BROWN, 2008). Em ovos mais velhos, o albúmen denso e o fino tornam-se indistinguíveis (VACLAVICK; CHRISTIAN, 2008).

Com relação à capacidade de formação de espuma, a clara de ovo forma uma das espumas de alta qualidade, devido às propriedades da ovoalbumina, globulinas e ovomucóide, que fazem parte da sua composição (CULBERTSON, 2006).

A clara do ovo possui 9,7% a 12% de proteínas (MINE, 1995), sendo considerado um sistema formado por inúmeras proteínas globulares. A ovalbumina, conalbumina, ovomucóide, ovomucina e lisozima representam quase a totalidade das proteínas (ZIEGLER, FOEGEDING, 1990). Mas é a ovalbumina, conalbumina que se encontram presentes em maior quantidade com 70% do total de proteínas, isso está diretamente relacionado com a propriedade de gelatinização do albúmen. As proteínas têm grande facilidade de se coagularem e, conseqüentemente funcionam como uma ligação com demais ingredientes (VADEHRA, NATH, 1973).

A capacidade de formação e estabilização da espuma pelas proteínas é variável, por isso, a mistura de proteínas que compõem a clara do ovo é particularmente adequada. As globulinas facilitam na formação da espuma, a ovomucina atua na estabilização, a ovoalbumina e conalbumina permitem a fixação através de coagulação térmica (BELITZ et al., 2009).

2.6.2 Gema

A gema é constituída por uma solução de partículas suspensas em proteína. Sua constituição é composta 65,5% de triglicerídeos, 28,3% de fosfolipídios e 5,2% de colesterol, 1% de carboidratos. A gema, por sua vez, adquire umidade pelo albúmen durante o período de armazenamento dos ovos, que pode variar de 46 a 59%, dependendo das condições de armazenamento e o tempo do mesmo (ORDÓNEZ, 2005; SOUZA-SOARES, SIEWERDT, 2005). Seu peso representa cerca de 30% a 35% do peso total (BRANDALIZE, 2001).

Membrana vitelina envolve a gema e possui em cada extremidade duas calazas, firmemente aderidas à superfície de um lado e em sua outra extremidade entrelaçada com as

fibras no albúmen, cuja função principal é estabilizar sua posição próxima a do centro geométrico do ovo. O blastocisto por sua vez, é um pequeno disco localizado na superfície da gema que contém o código genético do ovo (Figura 5) (ROSE, 1997; SOUZA-SOARES, SIEWERDT, 2005).

Segundo Ahn et al. (1997), há relação entre o conteúdo de sólidos encontrado na gema com a idade das poedeiras. As poedeiras mais velhas apresentam maior conteúdo de sólidos na gema, que os ovos de poedeiras jovens. Silversides e Scott (2001) comparando diferentes linhagens de poedeiras observaram que quanto maior a idade das poedeiras, maior é a porcentagem de gema. Carvalho et al. (2007) estudaram o efeito da linhagem e idade das galinhas poedeiras comerciais levando em consideração a relação entre gema e albúmen de ovos recém postos e, concluíram que a porcentagem de gema passa de 24,6% a 26,5% com o aumento da idade das poedeiras.

2.6.3 Qualidade dos Ovos

A qualidade dos ovos pode ser influenciada por fatores como o aumento do peso de ovo, variando com a idade da poedeira, e os associados às aves como fatores genéticos, idade, precocidade sexual, nutrição e o ambiente (LARBIER e LECLERCO, 1992). Alleoni, Antunes (2001) descrevem que a qualidade dos ovos pode ser reduzida com as condições e tempo de armazenamento.

Os critérios de qualidade estão associados em diferentes considerações, ou seja, para os produtores a qualidade está relacionada com o peso do ovo e resistência da casca (como defeitos, sujeiras, quebras e manchas de sangue), os consumidores consideram que a qualidade está relacionada ao prazo de validade e as características sensoriais (cor da gema e da casca), os processadores relacionam a facilidade de retirar a casca, separação de gema e clara, com as propriedades funcionais e com a cor da gema (produtos como massas) (ROSSI, POMPEI, 1995).

Cotta (1997) salienta que a qualidade interna e externa do ovo tende a piorar com a idade das poedeiras, o que levam a uma quantidade elevada de ovos trincados. Diferenças entre raças e linhagens, determinam as diferenças de cor, tamanho, forma e textura da casca, que influenciam em atributos de qualidade do albúmen e da gema.

A casca é uma embalagem natural, que tem como função a proteção do conteúdo interno, por isso deve ser limpa, íntegra e sem deformações. Quando apresentam deformações

graves, apresentam prejuízos visuais e a problemas sanitários, que provoca aspecto repugnante ao consumidor (ANTUNES, 2001).

As embalagens assumem grande importância, sendo considerado um dos critérios utilizados pelos consumidores na escolha do produto, em gôndolas dos supermercados, bem como, na manutenção da qualidade dos ovos. Portanto, assume o papel de diferenciação, acondicionamento e proteção na qualidade dos ovos de consumo, como forma de despertar o interesse dos consumidores (ANTUNES, 2001).

A refrigeração é uma prática comum utilizada para preservar os ovos. Segundo Souza (1997), este método age impedindo a desnaturação de proteínas e desestruturações físico-químicas que proporcionam mudanças na qualidade do ovo. Há cinco métodos para estimar a qualidade de ovos abertos, com bases quantitativas, relacionadas ao albúmen: altura da clara (WILGUS, VAN WAGENEN, 1936); índice do albúmen (HEIMAN, CARVER, 1936); índice da área do albúmen (PARSONS, MINK, 1937); porcentagem da clara espessa e fina (HOLTS, ALMIQUIST, 1932); e a unidade “Haugh” (HAUGH, 1937).

2.7 FATORES QUE AFETAM O VOLUME E A ESTABILIDADE DA CLARA DO OVO NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DA ESPUMA

Diversos fatores podem afetar a formação da espuma e sua consequente estabilização como temperatura, contaminação da clara com traços de gema de ovo, adição de açúcar e sal (NaCl) e pH.

A capacidade de formação de espuma pode ser melhorada pelo aquecimento da fração protéica, provocando um afrouxamento estrutural da proteína, o que permite seu rápido desdobramento. O aquecimento excessivo por sua vez, leva a intensa desnaturação provocando diminuição na estabilização e formação da espuma, isto ocorre devido a um decréscimo da solubilidade inicial da proteína, dando origem à formação de filmes interfaciais inflexíveis e rígidos (CULBERTSON, 2006; IBANOGLU, ERÇELEBI, 2007; TALANSIER et al., 2009).

As temperaturas de refrigeração por sua vez, diminuem a formação de espuma, enquanto, o aquecimento do albúmen seco a 80°C, por alguns dias, aumentam a estabilidade da espuma formada (SIKORSKI, 2007).

A indústria alimentícia de ovo tem problemas com a contaminação da clara de ovo por traços de gema devido a falhas no processo de separação entre albúmen e gema (WANG, WANG, 2009). A presença de gema reduz a formação de espuma drasticamente, devido a

presença dos lipídios da gema que, mesmo em concentrações mínimas, podem inibir a absorção de proteínas na interface ar/água. Os lipídeos evitam a formação do filme interfacial de proteínas, que conseqüentemente afeta o volume e a estabilidade da espuma, inibindo sua formação (KIOSSEOGLOU, PARASKEVOPOULOU, 2006; WANG, WANG, 2009; CULBERTSON, 2006).

A concentração de açúcar pode influenciar o volume de espuma formado, ou seja, quanto maior a concentração de açúcar menor o volume de espuma. Esta condição parece estar relacionada com a maior viscosidade do meio, impedindo que maior quantidade de ar seja incorporada ao sistema, porém, esta situação melhora a estabilidade da espuma formada (FOEGEDING et al., 2006; VACLAVICK, CHRISTIAN, 2008; YANG, FOEGEDING, 2010).

O pH da clara do ovo pode mudar dependendo do modo como é utilizado. A faixa de variação em ovos frescos é de 7,6 a 8,5, já em ovos armazenados por um período de tempo elevado pode chegar até 9,7. Um dos fatores que podem contribuir para o aumento do pH do albúmen é a perda de gás carbônico (CO₂), que ocorre através dos poros da casca (LI-CHAN; POWRIE; NAKAI, 1994; MINE, 1995).

Valores de pH abaixo de 6,0 próximo ao ponto isoelétrico (PI) da ovoalbumina (4,5), aumentam a capacidade de formação de espuma (SIKORSKI, 2007; LIANG, KRISTINSSON, 2007). A estabilidade e firmeza também aumentam em pH 5,0 (KUROPATWA, 2009). As proteínas ovoalbumina e ovomucóide encontram-se pouco carregadas eletricamente, fazendo com que a carga total das proteínas e a repulsão intermolecular destas em pH 5,0 seja baixa. Este aspecto resulta em uma adsorção intensa das proteínas do albúmen na interface ar-água, intensificando as interações criando filmes protéicos estáveis e firmes, o que explica uma maior estabilidade e firmeza da espuma neste pH (KUROPATWA, 2009).

A adição de cloreto de sódio (NaCl) influencia a capacidade de formação de espuma das proteínas, afetando sua solubilidade, viscosidade, desdobramento e agregação das proteínas (ZAYAS, 1997). O sal aumenta o volume e a capacidade de formação de espuma da clara do ovo, porém, reduz drasticamente sua estabilidade. Este fato pode ser atribuído a cargas neutras do NaCl, que abrigam as cargas das moléculas de proteína, reduzindo a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína adsorvidas e não-adsorvidas, facilitando a adsorção na interface ar/água (RAIKOS et al., 2007; VACLAVICK, CHRISTIAN, 2008).

Os sais normalmente reduzem a rigidez e a viscosidade dos filmes protéicos, isso acontece devido o enfraquecimento das interações peptídicas, conferindo o aumento da taxa

de expansão do volume da espuma em certas proteínas. Em determinadas concentrações os sais permitem uma melhor capacidade espumante, já em concentrações elevadas o sal pode diminuir o volume da espuma. (ALTSCHUL, WILCKS, 1985).

Segundo Oshodi e Ojokan (1997) o tipo de sal utilizado interfere diretamente no aumento ou na diminuição da capacidade espumante. Observaram que nas concentrações de 0,005 a 0,015g (m/m) houve um aumento na capacidade espumante, seguida da redução de 0,2g (m/m) utilizando NaCl.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) cedidas pela Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos, extrato de levedura (Vetec), Casein Enzyme Hydrolysate, Type I – Triptona (Himedia), NaCl (Biotec), H₂SO₄ (J.T. Baker), HCl (Proquímios), querosene (Guanabara), tolueno (Reagen), (NH₄)₂SO₄ (Vetec), fenol (Synth) MgSO₄.7H₂O (Nuclear), glicerina (Vetec), KH₂PO₄ (Vetec), K₂HPO₄ (F.Maia), ovo *in natura* (Yamada) foram os principais materiais utilizados neste trabalho.

3.2 MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: na primeira foi produzido o biosurfactante, compreendendo a seleção de cepas produtoras de biosurfactantes, produção de biomassa e biosurfactante e caracterização do biosurfactante (tensão superficial e índice de emulsificação) e, na segunda etapa houve a aplicação do biosurfactante em emulsão de clara de ovo, caracterizando quanto ao volume da espuma, estabilidade da emulsão (índice de sedimentação e capacidade de retenção de água), sinerése, solubilidade do nitrogênio e pH.

3.2.1 Seleção de Cepas Produtoras de Biosurfactantes

Foram utilizadas as cepas de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416) *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 598), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 652), cedidas pela Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos. A seleção da cepa foi realizada segundo a maior atividade do biosurfactante na redução da tensão superficial, por meio do método do Colapso da Gota segundo Monteiro (2007).

Foram inoculados os referidos microrganismos em caldo Luria – Bertani (LB) enriquecido com glicose 30 g.L⁻¹, cloreto de sódio (NaCl) 30 g.L⁻¹, sulfato de amônio ([NH₄]₂SO₄) 2 g.L⁻¹, sulfato de magnésio (MgSO₄) 0,5g.L⁻¹, extrato de levedura 20 g.L⁻¹ e solução de sais 20 mL [sulfato de zinco (ZnSO₄) 0,10g.L⁻¹, sulfato de manganês (MnSO₄) 3g.L⁻¹, sulfato de ferro (FeSO₄) 0,10g.L⁻¹, cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,10g.L⁻¹, cloreto de cobalto (CoCl₂) 0,10g.L⁻¹, cloreto de cobre (CuSO₄) 0,01g.L⁻¹, ácido bórico (H₃BO₃) 0,01g.L⁻¹ e permanganato de potássio (KMnO₄) 0,01g.L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹, em pH 7]. O pré-inóculo foi incubado a 30°C±2°C por 96 horas sob agitação a 200 rpm (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil). Posteriormente foram centrifugação a 3900 rpm,

por 30 minutos a 4°C, em centrífuga (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil). O sobrenadante do caldo de fermentação, 5 µL, foi adicionado em microplacas com 96 poços, contendo 4 µL óleo motor 40 submetidos à secagem em temperatura ambiente por 24 horas. O espalhamento da gota foi avaliado após 2 minutos e o resultado foi considerado positivo quando visualmente apresentava maior espalhamento da gota entre os biosurfactantes produzidos.

3.2.2 Produção de Biomassa

O cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) foi desenvolvido segundo delineamento experimental fatorial 2^2 , tendo como variáveis independentes o glicerol e óleo de soja residual proveniente de fritura e, as variáveis dependentes a produção e produtividade de biomassa, produção e produtividade de biosurfactante, eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante, eficiência de conversão de açúcar em biomassa, tensão superficial do biosurfactante, índice de emulsificação do biosurfactante e determinação de açúcar total (Tabela 1).

Tabela 1 - Planejamento experimental Fatorial 2²

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes									
	Glicerol	Óleo de soja	Produção de Biomassa (g.L ⁻¹)	Produtividade de Biomassa (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Produção de Biosurfactante (g.L ⁻¹)	Produtividade de biosurfactante (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Velocidade volumétrica de formação de biosurfactante (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (%)	Eficiência de conversão de açúcar em biomassa (%)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)	Índice de Emulsificação (%)	Açúcar Total (g.L ⁻¹)
1	1	1										
2	1	-1										
3	-1	1										
4	-1	-1										

Sinais codificados: -1 (ausência) e 1 (presença).

Segundo Monteiro (2007), foram adicionados 2 % (v/v) do inóculo (10^8 células.mL⁻¹) em 50 mL de Luria Bertani (LB) (triptona 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹), e incubados sob agitação a 200 rpm (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil) a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 264 horas. As variáveis dependentes foram analisadas em triplicatas, nos tempos de 0, 24, 96, 240 e 264 horas.

Na determinação da concentração da biomassa o caldo de fermentação foi centrifugado a 3900 rpm por 30 minutos a 4°C , em centrífuga (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil), para remoção da biomassa (Figura 6). O pellet (biomassa), ou seja, o precipitado, foi submetida a duas lavagens em 50 mL de água destilada estéril e centrifugado a 3900 rpm por 15 min a 4°C . Após, foi colocada em placas de Petri e conduzidas a dessecação a $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, até massa constante. Os resultados da produção, produtividade da biomassa foram expressos em g.L⁻¹ e g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.



Figura 6 - Biomassa de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) após centrifugação

3.2.3 Produção e Purificação do Biosurfactante

O cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) ocorreu em meio Salino Mineral [fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 3,0 g.L⁻¹, fosfato de potássio

dibásico (K_2HPO_4) $7,0 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, 30 g.L^{-1} de substrato glicerol e/ou óleo de soja residual oriundo de fritura e sulfato de amônio ($(NH_4)_2 SO_4$) e tampão fosfato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 7,0] em 50 mL, sob agitação a 200 rpm (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil) (Figura 7).



Figura 7 - Fermentado com *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), incubados a 30°C em 200 rpm por 264 horas

A concentração de biosurfactante foi determinada pelo extrato bruto adaptado de Monteiro (2007). O caldo de fermentação, após retirada da biomassa, foi centrifugado a 3900 rpm por 30 minutos a 4°C em centrífuga (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil) e, o biosurfactante foi dessecado a 50°C por 24 horas, até massa constante. Os resultados da produção e produtividade de biosurfactante foram expressos em g.L^{-1} e $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente.

Para purificação do biosurfactante, o sobrenadante retirado após processo de centrifugação foi acidificado ajustado o pH em 2, com HCl 6N e, mantido a 4 °C sob agitação por 12 horas, para precipitação do biosurfactante. O pellet (biosurfactante) foi separado por centrifugação a 3.900 rpm por 20 minutos, seguido de três lavagens sucessivas com água destilada.

3.2.4 Determinação da Tensão Superficial do Biosurfactante

A tensão superficial foi determinada pelo método do peso da gota segundo Behring et al. (2004) e Monteiro (2007).

Foi adicionado o caldo de fermentação em uma bureta de 10 mL, regulando sua vazão para 1 gota por minuto em Erlenmeyer de 250mL, previamente tarado. A gota foi pesada em balança analítica (MARTE, modelo AL 500, São Paulo, Brasil). Foi anotado o volume de uma gota gasto na bureta e, este processo foi repetido 10 vezes e determinado o peso médio do peso da gota. O cálculo da tensão superficial (γ) foi obtido pela razão entre o raio do orifício da bureta (Anexo A - Tabela 1A) pelo volume da gota conforme equação 1, e, os resultados expressos em mN.m^{-1} (Figura 8).

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{2 \pi \cdot r \cdot f} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde,

γ = tensão superficial (m.Nm^{-1})

m = peso médio da gota

g = gravidade

f = fator de correção f (Anexo A – Tabela 1B)



Figura 8 - Determinação da tensão superficial do biosurfactante pelo método do peso da gota

3.2.5 Determinação do Índice de Emulsificação do Biosurfactante

O índice de emulsificação (%) foi determinado após centrifugação do caldo de fermentação, a 3900 rpm a 4°C (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil) por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, diesel, gasolina e tolueno) em tubos de ensaio com 4 mL do sobrenadante de fermentação e, submetidos a agitação por 2 minutos em agitador de tubos de ensaio (Vortex Mixer, modelo KMC – 1300V, Vision Scientific Co., LTD – Korea), nos tempos de 0, 24, 96, 240 e 264 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.2.6 Determinação da Concentração de Açúcar Total de Fermentado com *Pseudomonas aeruginosa* (UPEDA 741)

A determinação da concentração de açúcar total foi analisada pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, 1956).

O método fenol-sulfúrico foi determinado a partir da curva de calibração (Gráfico 1). Para a curva de calibração foi preparado uma solução estoque a partir de 1 mL do caldo de fermentação e colocado em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água reagente tipo II, seguido de homogeneização. Na sequência, foi realizada novamente uma diluição, ou seja, 1 mL da primeira diluição foi adicionado em balão volumétrico de 100 mL e completado com água reagente tipo II. A partir da solução estoque foi retirado alíquotas de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mL e colocados em balões volumétricos de 100 mL e completado com água reagente tipo II. Foi retirado 1 mL de cada concentração e colocados em respectivos tubos de ensaios, devidamente identificados e em triplicata, e acrescentado 1 mL da solução de fenol a 5 % e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. Esta solução foi mantida em repouso, no escuro e em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este período foi conduzido a leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 480 nm (Cintra 10 CBG, São Paulo, Brasil).

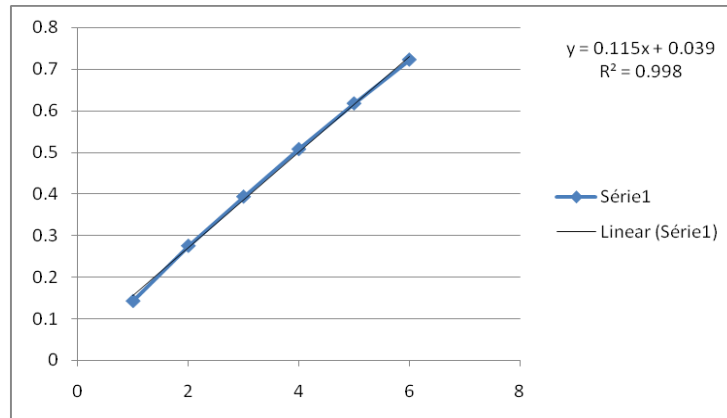


Gráfico 1- curva para determinação da concentração de açúcar total

Para determinar a concentração de açúcar total das amostras foi retirado 1 mL do caldo de fermentação, adicionado 1 mL da solução de fenol a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico P.A (Figura 9). Esta solução foi mantida em repouso no escuro e em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este período, foi conduzido a leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 480 nm (Cintra 10 CBG, São Paulo, Brasil). A absorbância obtida foi aplicada sobre a equação $y = 0,115x + 0,039$ e os resultados expressos em g.L^{-1} .



Figura 9 - Determinação de açúcar total pelo método fenol sulfúrico

3.3 EMULSÃO DA CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE

3.3.1 Produção e Caracterização da Emulsão da Clara de Ovo com Biosurfactante

Previamente foram utilizados pré-testes para determinar a quantidade de biosurfactante e o momento da adição de biosurfactante no albúmen.

A produção de emulsão da clara de ovo com biosurfactante foi realizada segundo planejamento fatorial 2^2 , com três pontos centrais (Tabela 2), tendo como variáveis independentes as concentrações de biosurfactante e clara do ovo. As variáveis dependentes foram volume da espuma, estabilidade da emulsão, sinérese, solubilidade do nitrogênio e pH.

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes				
	Biosurfactante	Clara de ovo	Volume da espuma (%)	Estabilidade da emulsão (%)	Sinérese (%)	Solubilidade do nitrogênio (g.L ⁻¹)	pH
1	+1	+1					
2	-1	+1					
3	+1	-1					
4	-1	-1					
5	0	0					
6	0	0					
7	0	0					

Nota: sinais codificados - biosurfactante: +1 (1,25g), -1 (0,5g), 0 (0,75g) e clara de ovo: +1 (35g), -1 (20g), 0 (30g)

O albúmen foi separado da gema, adicionado ao biosurfactante e submetido à agitação em batedeira (Arno, mod.BPA 60HZ) durante 4 minutos, em potência 5.

3.3.2 Volume da Espuma

A determinação do volume da espuma foi realizado segundo método de Britten e Lavoie (1992), pela relação entre o volume inicial da emulsão com agente biosurfactante antes da aeração e o volume de espuma formado após aeração. Os resultados são apresentados na equação 2.

$$\% \text{ aeração} = (\text{volume inicial} - \text{volume final} / \text{volume inicial}) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

3.3.3 Estabilidade da Emulsão

A estabilidade da emulsão foi analisada considerando a capacidade de retenção de água (CRA) segundo Remeuf et al. (2003) e, o índice de sedimentação (IS) segundo Romero et al. (2008).

A capacidade de retenção de água foi determinada com 3g da emulsão e centrifugada a 3.900 rpm por 45 minutos, a 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi pesado em balança (GEHAKA, modelo BK 2000, São Paulo, Brasil), obtendo o valor do soro expelido. O cálculo da capacidade de retenção de água foi realizada segundo equação 3, e os resultados expressos em porcentagem (%).

$$\text{CRA} = \frac{(S_0 - S_E)}{S_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde,

CRA = capacidade de retenção de água (%)

S_0 = peso da emulsão utilizada (g)

S_E = peso da quantidade de soro expelido (g)

O índice de sedimentação foi determinado com 3g da emulsão, mantida a 7 °C por 24 horas. Decorrido esse tempo, o soro liberado foi pesado em balança (GEHAKA, modelo BK 2000, São Paulo, Brasil), para verificar sua massa. O cálculo do índice de sedimentação foi realizada segundo equação 4, e os resultados expressos em porcentagem (%).

$$\text{IS} = \frac{\text{SL}}{\text{PE}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde,

IS = Índice de sedimentação (%)

SL = peso de soro liberado (g)

PE = peso da emulsão inicial (g)

3.3.4 Sinérese

A presença de sinérese foi determinada por gravimetria utilizando becker de 250 mL e uma peneira doméstica. O volume do líquido que ficou depositado no fundo do becker, previamente tarado, foi pesado. O cálculo da porcentagem de sinérese foi realizado segundo Khouryier, Aramouni e Herald (2005). Os resultados foram analisados conforme equação 5, e os resultados expressos em porcentagem (%).

$$\text{Sinérese (\%)} = (\text{peso do líquido liberado/peso total da amostra}) \times 100 \text{ (Eq.5)}$$

3.3.5 Determinação da Solubilidade do Nitrogênio

A determinação da solubilidade do nitrogênio foi realizada pelo método KJELDAHL segundo Instituto Adolf Lutz (1995), com adaptação.

A emulsão foi acidificada com ácido tricloroacético (TCA) 33% e centrifugada (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil) a 3900 rpm por 15 minutos, a 4°C. Foi retirado 1 mL do sobrenadante e colocado em tubos de Kjeldahl, acrescentados de 1,5g do catalisador (mistura catalítica: 94 g de K₂SO₄; 5 g de CuSO₄). Em seguida foi adicionado 5 ml de ácido sulfúrico P.A (Synth) e conduzidos a digestão em digestor (Solab SL 25/40), com temperatura de 50°C a 350°C (com aumento gradual), até ficar com coloração verde claro límpido. Depois de completa a digestão, as amostras foram destiladas em destilador (Solab SL 74), utilizando hidróxido de sódio 35% misturado a amostra e, ácido bórico 5% com indicador misto (Metil Orange e carbonato de sódio (Vetec)) na saída do destilador. Em bureta de 10ml com HCl 0,02N (M=0,17) a amostra depois de destilada foi titulada, até viragem de cor roxa claro. A solubilidade de nitrogênio foi calculado segundo a equação 6.

$$\% \text{ Nitrogênio solubilizado} = \frac{(V \times M \times Fc \times 1,4008)}{\text{Volume da amostra}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde,

V = volume de HCl gasto na titulação (mL)

M = Molaridade do HCl (0,02N)

Fc = Fator de correção do HCl (1,03)

3.3.6 Potencial Hidrogeniônico

A medida do pH foi realizado por imersão direta do eletrodo na emulsão de clara de ovo com biosurfactante, com peagâmetro (Digital Tec – 2 mp, Piracicaba – SP, Brasil).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em nível de 95% de confiança. Os parâmetros estudados foram analisados pela metodologia de análise de superfície de resposta, utilizando o programa Statistica versão 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES

As cepas *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) apresentaram biosurfactante com maior redução na tensão superficial, em óleo de motor 40 (Figura 10). Desta forma, foi utilizada para produção de biosurfactante, com posterior aplicação em emulsão de clara de ovo.



Figura 10 – Redução da tensão superficial por biosurfactante produzido por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA), pelo método da gota, em óleo de motor 40

4.2 PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DE *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741)

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores das médias da produção e da produtividade da biomassa, entre os tratamentos e durante o período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 3A e 4A).

A produção de biomassa apresentou oscilação durante o processo fermentativo em todos os tratamentos. No entanto, o tratamento 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) apresentou aumento gradual de biomassa até 240 horas (Gráfico 2).

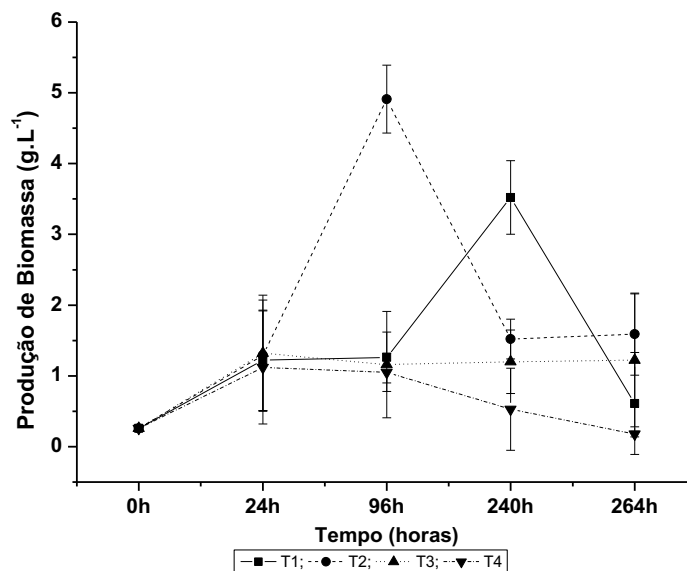


Gráfico 2 – Evolução da produção de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Considerando o início e final da fermentação houve aumento de biomassa de 129,3%, 497,7% e 358,6%, nos tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 5). O tratamento 4 apresentou redução de 32,3%, possivelmente devido a reduzida fonte de carbono no meio de cultivo, proveniente apenas da quantidade encontrada no inóculo inicial.

A interrupção do crescimento celular, pode ser atribuída à limitação das fontes de carbono e, a relação entre carbono e nitrogênio se torna importante para o rendimento de qualquer molécula bioativa (REIS et al, 2004; OCHSNER et al., 1996; SANTOS et al., 2002; MERCADÉ et al., 1993; DESAI et al., 2003). A fonte de nitrogênio em associação com a de carbono, favorece a manutenção do processo enzimático, este, necessário para a produção de biosurfactantes ramnolípidicos (OCHSNER et al., 1995).

Tabela 5- Produção de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

PRODUÇÃO DE BIOMASSA (g.L ⁻¹)	Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	0	0,26 ± 0	0,26 ± 0	0,26 ± 0	0,26 ± 0	0,26 ^A
	24	1,22 ± 0,71	1,29 ± 0,78	1,32 ± 0,82	1,12 ± 0,80	1,24 ^A
	96	1,26 ± 0,36	4,91 ± 0,48	1,16 ± 0,75	1,05 ± 0,27	2,09 ^A
	240	3,52 ± 0,52	1,52 ± 0,28	1,20 ± 0,45	0,53 ± 0,58	1,69 ^A
	264	0,61 ± 0,72	1,59 ± 0,58	1,22 ± 0,94	0,18 ± 0,04	0,90 ^A
	M	1,37 ^a	1,91 ^a	1,03 ^a	0,63 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

A maior produção de biomassa, 4,91 g.L⁻¹, foi observado no tratamento 2 (adição de glicerol) em 96 horas. Vieira e Cardoso (2011) encontraram valores próximos, ou seja, 4,60 g.L⁻¹ de *Pseudomonas aeruginosa* PATC, em 48 horas, mas em condições de produção diferenciadas de aeração (0,5 vvm) e agitação (550 rpm). Reis et al. (2004) observaram que *Bacillus subtilis* ATCC 6633 cultivado em fermentado com glicose, açúcar comercial, suco de cana de açúcar, glicerol, manitol e óleo de soja produziu 2,4 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 2,5 g.L⁻¹, 1,3 g.L⁻¹, 1,9 g.L⁻¹ e 3,3 g.L⁻¹, respectivamente, de biomassa em 48 horas.

A maior produtividade da biomassa foi verificada em 24 horas em todos os tratamentos. No entanto, entre 24 horas e 264 horas do tempo de fermentação, houve redução em todos os tratamentos de 95,5%, 88,6%, 91,6% e 98,7% nos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual), 2 (adição de glicerol), 3 (adição de óleo de soja residual) e 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual), respectivamente (Gráfico 3) e (Tabela 6).

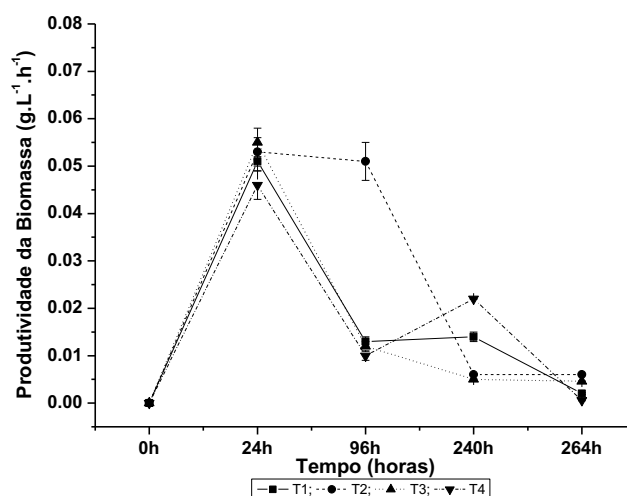


Gráfico 3 – Evolução da produtividade de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Tabela 6 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA, EM FERMENTADO COM GLICEROL E ÓLEO DE SOJA RESIDUAL, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	0	0±0	0±0	0±0	0±0	0 ^B
	24	0,051±0,002	0,053±0,003	0,055±0,003	0,046±0,003	0,051 ^A
	96	0,013±0,001	0,051±0,004	0,012±0,001	0,010±0,001	0,021 ^{AB}
	240	0,014±0,001	0,006±0,000	0,005±0,000	0,022±0,000	0,007 ^B
	264	0,002±0,0002	0,006±0,000	0,004±0,000	0,001±0,000	0,003 ^B
	M	0,016 ^a	0,023 ^a	0,015 ^a	0,012 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Os tratamentos 2 (adição de glicerol) e 3 (adição de óleo de soja residual) apresentaram maior produtividade de biomassa ($0,055 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e, 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual) apresenta menor produtividade de biomassa ($0,0006 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), respectivamente, durante o período de fermentação (tabela 6).

A análise de superfície de resposta mostra que nos tratamentos com glicerol houve maior produção e a produtividade de biomassa (Figura 11).

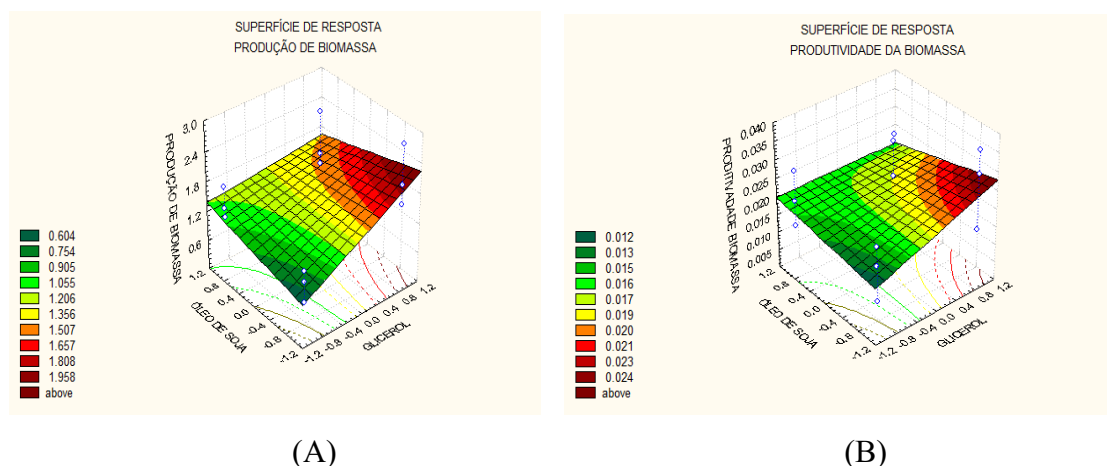


Figura 11 – Superfície de resposta da produção (a) e produtividade (b) de biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Segundo Guerra-Santos et al. (1984), em estudo de produção de ramnolipídeos (biosurfactante) em fermentação contínua, utilizando glicose como fonte de carbono, mostraram que a fonte de carbono é consumida para a multiplicação celular, e conseqüente aumento na biomassa.

4.3 PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE BIOSURFACTANTE

A produção e a produtividade de biosurfactante não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores das médias entre os tratamentos e durante o período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 7A e 8A).

A produção de biosurfactante aumentou durante o tempo de fermentação, com exceção em 96 horas, em todos os tratamentos (Gráfico 4). Este aspecto pode estar relacionado a produção de biomassa neste tempo, quando o microrganismo encontra-se na fase estacionária da curva de crescimento (Gráfico 2).

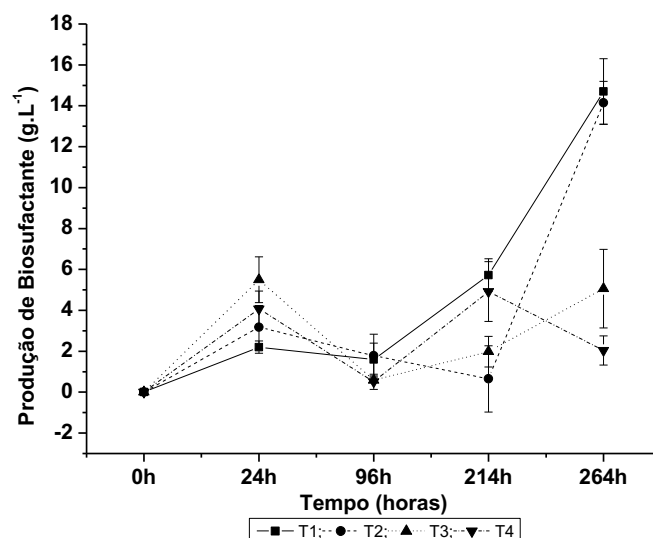


Gráfico 4 – Evolução da produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, com diferentes concentrações

Os tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) e 2 (adição de glicerol) apresentaram aumentos de 568,1% e 344,9%, respectivamente, considerando o período de 24 e 264 horas do processo de fermentação. Reduções de 8,0 e 49,8% foram verificadas nos tratamentos 3 (adição de óleo de soja residual) e 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual), respectivamente.

Segundo Rahmam et al. (2002), embora o potencial de produção de biosurfactantes seja determinado pela genética do microrganismo outros fatores como as condições ambientais e a natureza do substrato podem influenciar o nível de expressão genética. Este fato foi verificado neste trabalho em fermentados com glicerol, com maior produção de biosurfactantes, nos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) com 14,7 g.L⁻¹ e 2 (adição de glicerol) com 14,1 g.L⁻¹, respectivamente, em 264 horas de fermentação (Tabela 9).

Em trabalho desenvolvido por DUARTE (2003) sobre a caracterização de bactérias produtoras de rhamnolípideos isolados de poços de petróleo, foi encontrado 0,71 g.L⁻¹ de biosurfactante, em fermentados contendo glicerol como fonte de carbono, no período de 72 horas.

Tabela 9 - Produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE (g.L ⁻¹)	Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	0	0±0	0±0	0±0	0±0	0 ^A
	24	2,20±0,63	3,18±1,06	5,50±1,12	4,07±0,87	3,92 ^A
	96	1,60±0,80	1,78±1,05	0,58±1,01	0,51±0,37	1,47 ^A
	240	5,72±0,78	6,50±1,62	1,98±0,75	4,92±1,46	5,55 ^A
	264	14,70±1,60	14,15±1,05	5,06±1,92	2,04±0,71	11,00 ^A
	M	4,84 ^a	5,12 ^a	5,15 ^a	2,43 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Lima et al., (2007) encontraram 4,59 g.L⁻¹ de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), em 48 horas. Santa Anna et al., (2002) verificaram produção de biosurfactante de 3,16 g/L de ramnolipídeos, quando utilizaram glicerol como fonte de carbono. Rahman et al.(2002) verificaram aumento significativo na produção de ramnolipídeos substituindo o óleo de girassol (2,98 g.L⁻¹) e o glicerol (1,77 g.L⁻¹) por óleo de soja (4,31 g.L⁻¹), indicando uso do óleo de soja como fonte de carbono de baixo custo para a produção de ramnolipídeos. Lima et al., (2007) encontraram 4,59 g.L⁻¹ de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), em 48 horas.

A produtividade de biosurfactante apresentou declínio após 24 horas do período de fermentação, com reduções de 40,2%, 59,8%, 78,9% e 96,4% nos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual), 2 (adição de glicerol), 3 (adição de óleo de soja residual) e 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual), respectivamente (Gráfico 5).

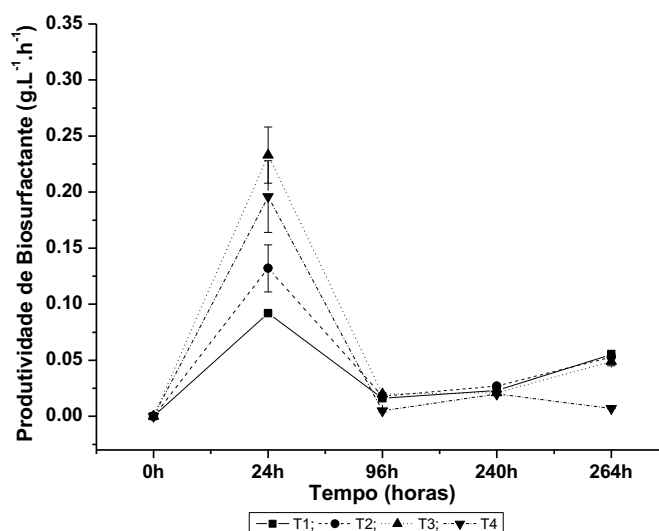


Gráfico 5 – Evolução da produtividade de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

A maior produtividade de biosurfactante foi verificada pelo tratamento 3 (adição de óleo de soja residual) com $0,233 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em 24 horas do período de fermentação. O tratamento 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual) mostrou menor produtividade ($0,007 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em 264 horas (Tabela 10).

Tabela 10- Produtividade de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

PRODUTIVIDADE DE BIOSURFACTANTE ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
		0	0±0	0±0	0±0	0±0
24	0,092±0,010	0,132±0,021	0,233±0,025	0,196±0,032	0,160 ^A	
96	0,016±0,001	0,018±0,001	0,020±0,001	0,005±0,00	0,010 ^{AB}	
240	0,023±0,001	0,027±0,001	0,021±0,002	0,020±0,001	0,020 ^B	
264	0,055±0,004	0,053±0,006	0,049±0,004	0,007±0,00	0,040 ^B	
M	0,030 ^a	0,040 ^a	0,060 ^a	0,040 ^a		

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Gouveia et al., (2003) apresentam valores de produtividade de biosurfactante produzido por *Pseudomonas sp.* 615 E2; *Pseudomonas sp.* 572 BB2, *Pseudomonas sp.* 570 BA2 acima de $0,007 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ entre 72 e 96 horas.

A análise de superfície de resposta mostra que altas concentrações de glicerol e óleo de soja residual proporcionaram maior produção de biosurfactante (Figura 12A). Entretanto, altas concentrações de óleo de soja residual influenciaram na produtividade de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (Figura 12B).

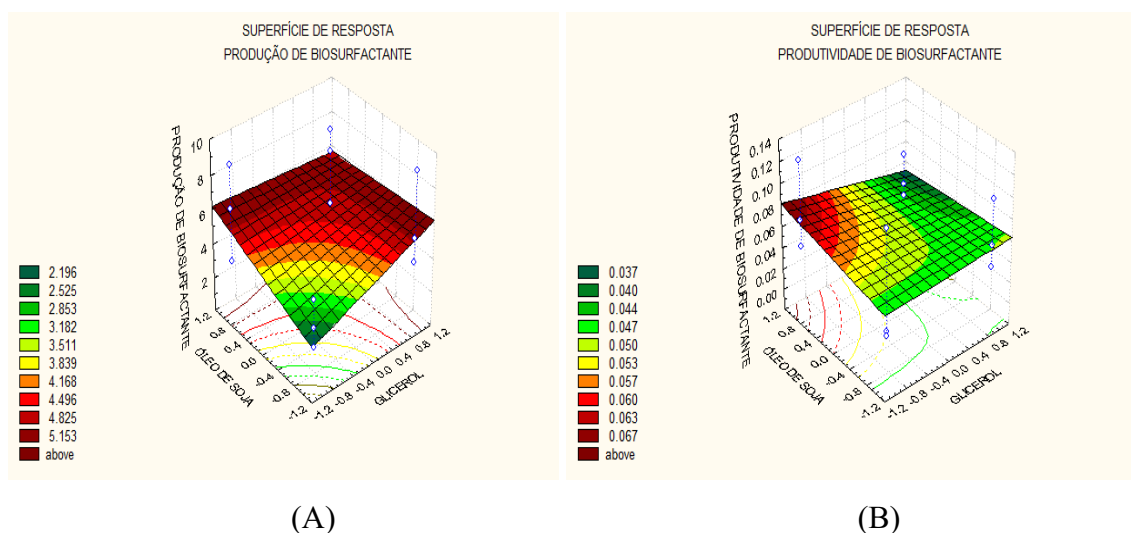


Figura 12 – Superfície de resposta da produção e produtividade de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

4.4 AÇÚCAR TOTAL

4.4.1 Concentração de Açúcar Total e Velocidade Volumétrica de Consumo de Açúcar em Meio de Cultivo com *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741)

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores das médias da concentração de açúcar em fermentado com *Pseudomonas aeruginosa*, entre os tratamentos e durante o período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 11A).

A concentração de açúcar no fermentado apresentou variação inicial, possivelmente causado por erros de calibragem dos equipamentos utilizados na pesagem e pipetagem, ou seja, aspectos inerentes do processo. No entanto, durante o período de fermentação houve oscilação, ou seja, com aumento até 24 horas com exceção do tratamento 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual), declínio

posterior até 96 horas e aumento até 264 horas (Gráfico 6). O aumento da concentração de açúcar durante o período de fermentação pode estar relacionado a hidrólise gradual do glicerol e o óleo de soja residual pelo microrganismo, sendo estes as fontes de carbono disponíveis no meio de cultivo.

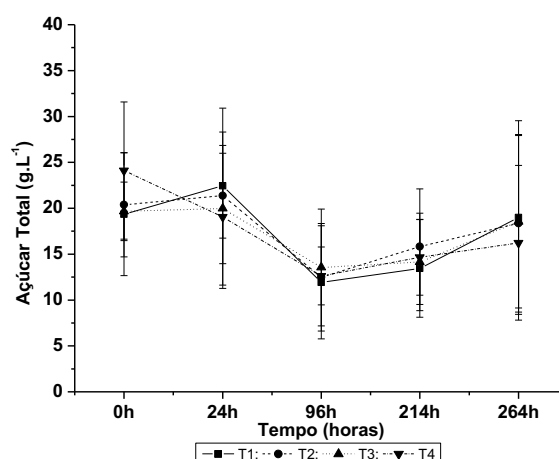


Gráfico 6 – Evolução da concentração de açúcar em fermentado com *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), adicionado de glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

O tratamento 1 apresentou a menor concentração de açúcar, 11,9 g.L⁻¹, em 96 horas do processo fermentativo (Tabela 12), este fato sugere maior consumo de açúcar neste período.

Tabela 12 - Concentração de açúcar (CAÇ) em fermentado com *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), adicionado de glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
	1	2	3	4	M
0	19,34±6,69	20,37±5,68	19,67±3,18	24,10±7,47	20,87 ^A
24	22,44±8,46	21,37±4,62	19,97±8,34	19,06±7,78	20,71 ^A
96	11,92±6,16	12,48±5,85	13,55±6,35	12,63±3,15	12,65 ^A
240	13,45±5,31	15,82±6,30	14,15±5,31	14,66±4,13	14,52 ^A
264	18,99±10,55	18,37±9,67	18,53±9,40	16,24±8,42	18,03 ^A
M	17,23 ^a	17,68 ^a	17,17 ^a	17,34 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Considerando o início e final do processo fermentativo houve redução na concentração de açúcar no meio de cultivo de 1,8%, 9,8%, 5,8% e 32,6%, nos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual), 2 (adição de glicerol), 3 (adição de óleo de soja residual) e 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja), respectivamente. Portanto, o tratamento 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual) apresentou maior redução na concentração de açúcar total (Gráfico 7).

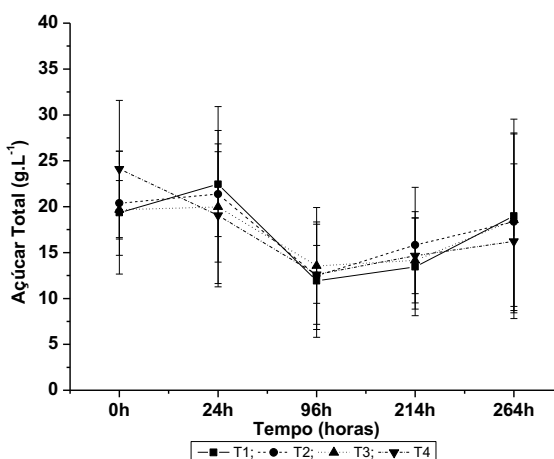


Gráfico 7- Evolução da concentração de açúcar por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

O valor maior obtido na redução da concentração de açúcar foi observada no tratamento 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual) do início ao fim da fermentação, este fato pode estar relacionado a adição do inoculo inicial, com parte do açúcar presente no caldo de manutenção (caldo Luria Bertani) quando transferido para o meio de fermentação.

O biosurfactante por sua vez é um mono-ramnolipideo e de acordo com Lima (2007), em trabalho sobre a produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual, percebeu um grande consumo de nitrogênio e fósforo que influenciaram tanto na produção de biomassa como também na síntese de biosurfactante.

Santos et. al. (2002) relata em trabalho sobre a avaliação de diferença carbono em fontes de nitrogênio na produção de ramnolipideos por *Pseudomonas aeruginosa*, que fontes de nitrogênio e fósforo estimulam o crescimento celular, o que pode ter influenciado indiretamente na produção de ramnolipideo.

Desta forma, ao aferirmos a concentração de açúcar durante o processo fermentativo, notamos maior consumo no tratamento onde não havia fonte de carbono.

Consumo maior foi encontrado por Cruz (2009), em fermentado com glicerol e inoculado com *Bacillus subtilis* LAMI 008 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, com redução na concentração de açúcar de 88%.

A análise de superfície de resposta mostra que altas concentrações de glicerol influenciaram no teor de açúcar em meio de cultivo com *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), durante o período de fermentação (Figura 13). Estes aspectos são confirmados pelos resultados dos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) e 2 (adição de glicerol). O tratamento 1 apresentou maior produção de biosurfactante em 264 horas, consumo de açúcar em 96 horas (concentração de 11,9%) e conversão de açúcar em biomassa em 96 horas e, o tratamento 2 mostrou maior produção de biomassa em 96 horas.

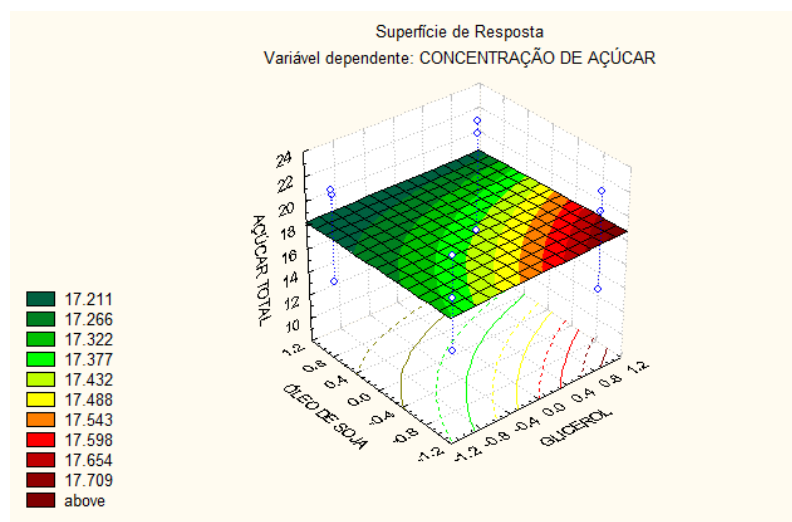


Figura 13 – Superfície de resposta da concentração de açúcar durante o período de fermentação, com *pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), adicionado de glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

A maior velocidade de consumo de açúcar foi observado em 24 horas do processo fermentativo, nos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual), 2 (adição de glicerol) e 3 (adição de óleo de soja residual) e, em seguida houve redução em 96 horas. O tratamento 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual) apresentou declínio em 24 horas e aumento em 96 horas. Após este período, todos os tratamentos apresentaram estabilidade na velocidade de consumo até o final do processo

fermentativo (Gráfico 8). Estes aspectos podem estar relacionados com a maior produtividade de biomassa e biosurfactante, neste mesmo período da fermentação, ou seja, 24 horas.

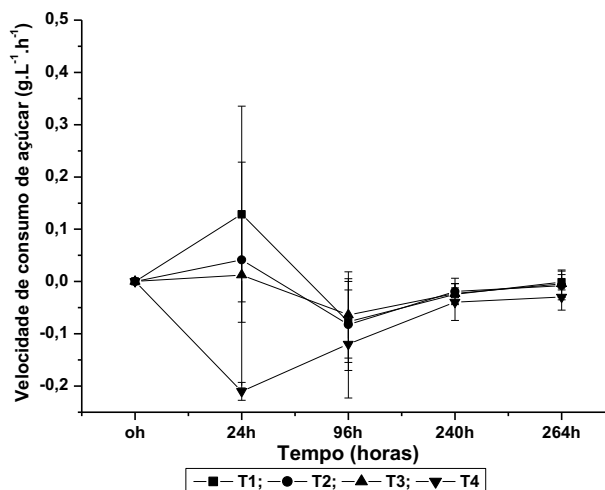


Gráfico 8 – Velocidade volumétrica de consumo de açúcar por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

4.4.2 Eficiência de Conversão de Açúcar em Biomassa

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores das médias da eficiência de conversão de açúcar em biomassa, entre os tratamentos e durante o período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 13A).

A conversão de açúcar em biomassa foi maior em 96 horas em todos os tratamentos, com 73,4%, 67,9%, 67,2% e 33,9% nos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual), 2 (adição de glicerol), 3 (adição de óleo de soja residual) e 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual), respectivamente. Porém, considerando todo o período de fermentação o tratamento 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) apresentou menor eficiência de conversão de açúcar em biomassa (Gráfico 9) (Tabela 14).

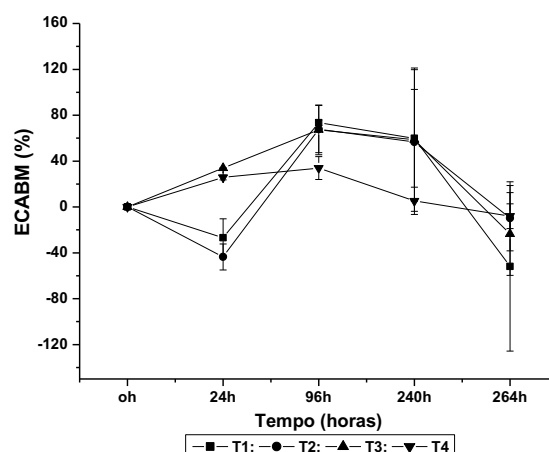


Gráfico 9 – Evolução da eficiência de conversão de açúcar em biomassa (ECABM), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Tabela 14 - Eficiência de conversão de açúcar em biomassa (ECABM), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
	1	2	3	4	M
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0 ^{AB}
24	-26,80±16,59	-43,61±11,42	33,93±0,07	25,70±2,11	-25,76 ^{AB}
96	73,48±2,35	67,93±20,53	67,26±21,65	33,97±9,96	27,25 ^{AB}
240	59,84±42,61	56,66±63,09	58,69±62,43	5,28±0,01	59,91 ^A
264	-51,91±73,83	-9,75±28,51	-23,56±36,05	-8,00±10,82	-25,56 ^B
M	4,43 ^a	-24,60 ^a	44,46 ^a	4,38 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Roman (2005) encontrou 2,4 g de água por grama de proteína na capacidade de retenção de água, em hidrolisados enzimáticos, com grau de hidrólise de 5,7%.

A capacidade de retenção encontrada neste trabalho mostrou-se inferior a encontrada por Antunes (2003), que observou 73,04% na capacidade de retenção de água, em géis de concentrados protéicos de soro de leite, quando submetido a 9% de proteína, 83°C, pH de 4,3, no período de 18 minutos.

A análise de superfície de resposta mostra que fermentados com óleo de soja residual tiveram maior influencia na conversão do açúcar em biomassa (Figura 14).

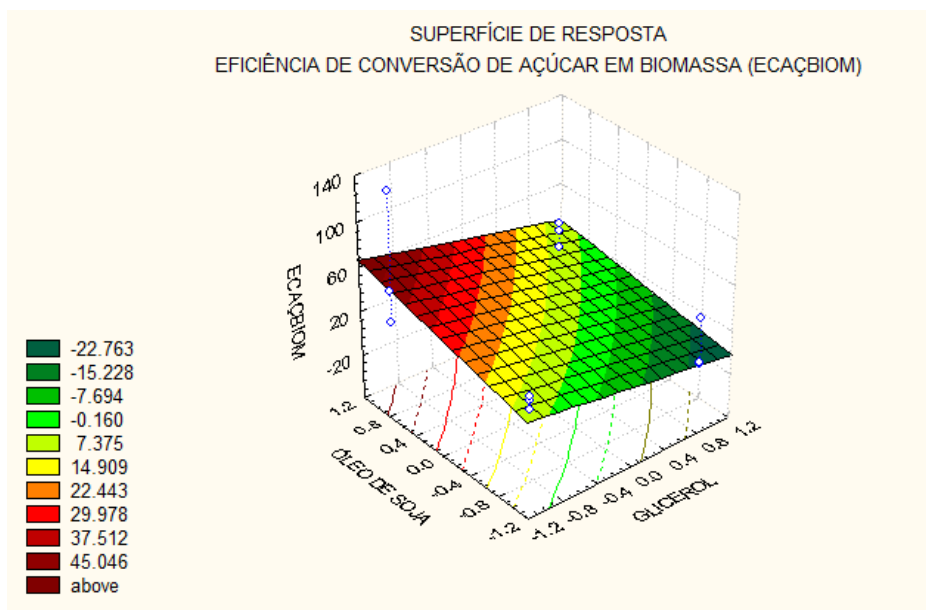


Figura 14 – Superfície de resposta da eficiência de conversão de açúcar em biomassa, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

4.4.3 Eficiência de Conversão de Açúcar em Biosurfactante

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores das médias da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante, entre os tratamentos e durante o período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 15A).

A maior eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante foi observado no tratamento 3 (adição de óleo de soja residual) em 24 horas, 71,7%. Durante o período de fermentação houve oscilação em todos os tratamentos (Gráfico 10). No entanto, considerando a conversão de açúcar em biosurfactante entre 24 horas e 264 horas, do tempo de fermentação, os tratamentos 2 (adição de glicerol) e 3 (adição de óleo de soja residual) apresentaram aumentos de 562,7% e 518 %, respectivamente. Os tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) e 3 (adição de óleo de soja residual) mostraram redução de 35,9% e 81,2%.

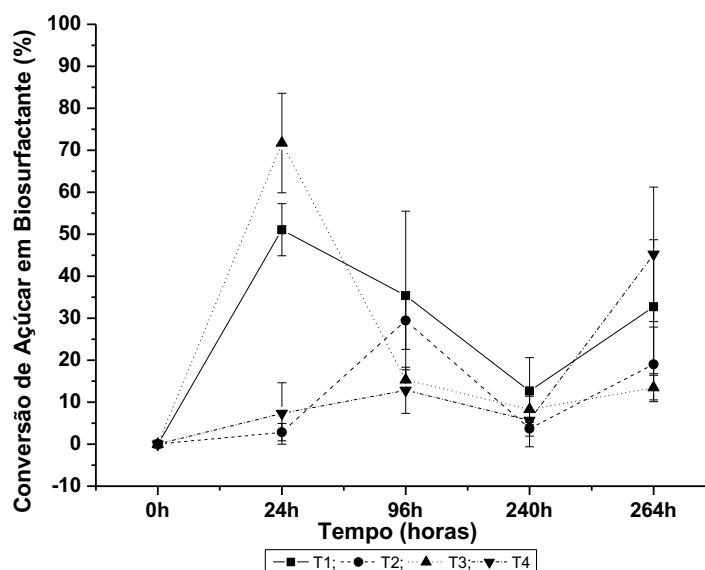


Gráfico 10 – Evolução da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante, em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Segundo Medeiros (2007), em trabalho sobre obtenção de éster de açúcar, utilizando protease de *Bacillus subtilis*, encontrou valores referentes à conversão de ácido ricinoléico em biosurfactante de 25,7% quando submetido a uma temperatura de 60°C, tempo de fermentação de 7 dias e uma concentração de enzima de 40 mg/mL.

O presente trabalho obteve valores superiores em 24 horas, 71,75% no tratamento 3 (adição de óleo de soja residual), no que se refere à eficiência de conversão de substrato em biosurfactante.

Tabela 16 - Eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (ECAÇBIOS) por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

ECAÇBIOS (%)	Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	24	51,07±6,26	2,87±2,04	71,75±11,86	7,32±7,34	33,25 ^A
	96	35,34±20,10	29,42±6,84	15,29±2,41	12,85±5,49	23,22 ^A
	240	12,65±7,90	3,71±1,80	8,29±3,13	5,67±0,27	7,58 ^A
	264	32,74±5,90	19,02±8,92	13,46±8,92	45,24±6,02	27,62 ^A
	M	32,95 ^a	13,76 ^b	27,20 ^{ab}	17,77 ^b	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

A análise de superfície de resposta mostra que fermentados com óleo de soja residual tiveram maior influência na conversão do açúcar em biosurfactante (Figura 15).

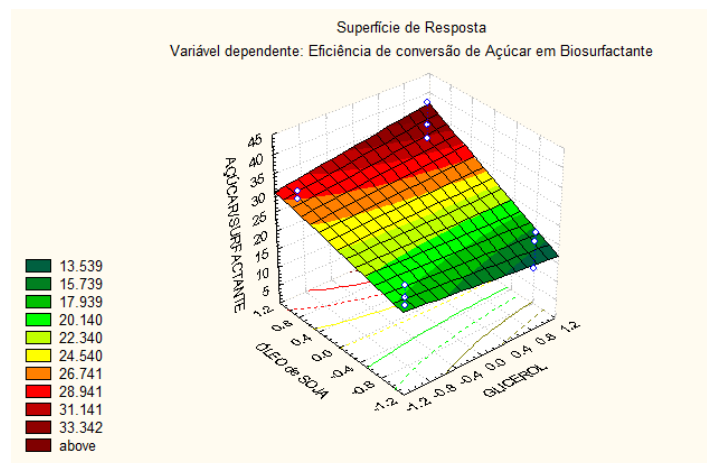


Figura 15 – Superfície de resposta da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

4.5 TENSÃO SUPERFICIAL

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores das médias da tensão superficial, entre os tratamentos e durante o período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 17A).

Durante o período de fermentação os biosurfactantes produzidos pelos tratamentos 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual), 2 (adição de glicerol) e 3 (adição de óleo de soja residual) apresentaram redução da tensão superficial de 55,85%, 39,03% e 8,47%, respectivamente. O tratamento 4 (sem adição de glicerol e óleo de soja residual), apresentou aumento de 1,93% na tensão superficial (Gráfico 11) (Tabela 18). Desta forma, foi verificado que o tratamento 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) com maior produção de biosurfactante ($14,7 \text{ g.L}^{-1}$) também apresentou maior redução da tensão superficial, 55,85%.

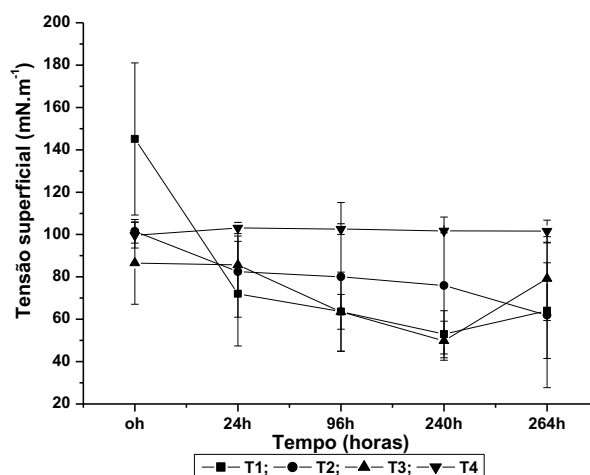


Gráfico 11 – Tensão superficial de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

Tabela 18 – Tensão superficial de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

TENSÃO SUPERFICIAL (mN.m ⁻¹)	Tempo (horas)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	0	145,13±35,93	101,51±5,55	86,52±19,46	99,65±6,07	92,67 ^B
	24	72,05±24,69	82,41±21,41	85,62±13,69	103,12±2,63	85,80 ^A
	96	63,56±18,71	80,03±35,06	63,49±8,17	102,54±2,51	77,40 ^{AB}
	240	52,94±11,12	75,91±32,37	49,85±9,24	101,71±0,88	70,10 ^B
	264	64,07±22,58	61,88±34,15	79,19±19,48	101,58±5,25	76,68 ^B
	M	67,12 ^a	80,35 ^a	72,94 ^a	101,72 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Em trabalho desenvolvido por Duarte (2003), foram encontrados reduções de 27,5 % na tensão superficial e produção de biosurfactante de 0,71 g.L⁻¹, em fermentados contendo glicerol como fonte de carbono, no período de 72 horas.

Piróllo (2006) utilizando diferentes fontes de carbono, encontrou em fermentados de *Pseudomona aeruginosa* LBI, redução da tensão superficial de 45%, 36,5% e 37,7% quando usou como substrato 20% de querosene, 30% de óleo diesel, 10% de petróleo, durante 168 horas de fermentação.

Bednarski et al. (2004) utilizando cepas de *Candida antarctica* e *Candida apicolavalores* verificou redução na tensão superficial de 50,5%, ao final do processo

de fermentação, 144 horas, utilizando como fonte de carbono 10% de resíduo de refinaria.

A análise de superfície de resposta mostra que as variáveis independentes, glicerol e óleo de soja residual, não apresentaram influência significativa nos resultados da tensão superficial (Figura 16).

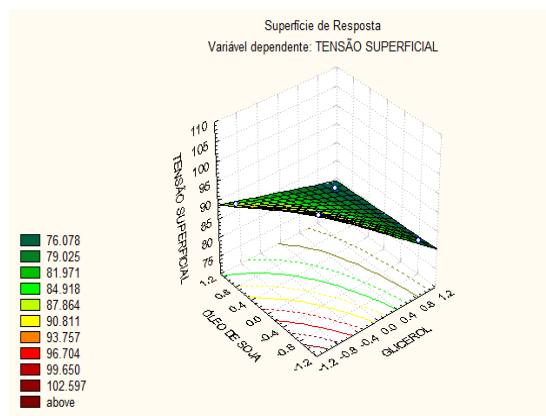


Figura 16 – Superfície de resposta da tensão superficial de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações

4.6 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos valores das médias do índice de emulsificação ao querosene, tolueno, diesel e gasolina, entre os tratamentos. Porém, durante o período de fermentação só houve significância estatística para o tolueno e o diesel. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice A – Tabelas 19A, 20A, 21A e 22A).

O biosurfactante com maior índice de emulsificação foi observado no tratamento 1 (adição de glicerol e óleo de soja residual) com 92,56% em 240 horas, quando utilizado o tolueno. O menor índice foi verificado no tratamento 3 (com óleo de soja) com 1,18% em 96 horas utilizando diesel (Gráfico 12), (Tabelas 23, 24, 25, 26 e 27).

Os resultados mostram que o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), possui alta capacidade emulsificante.

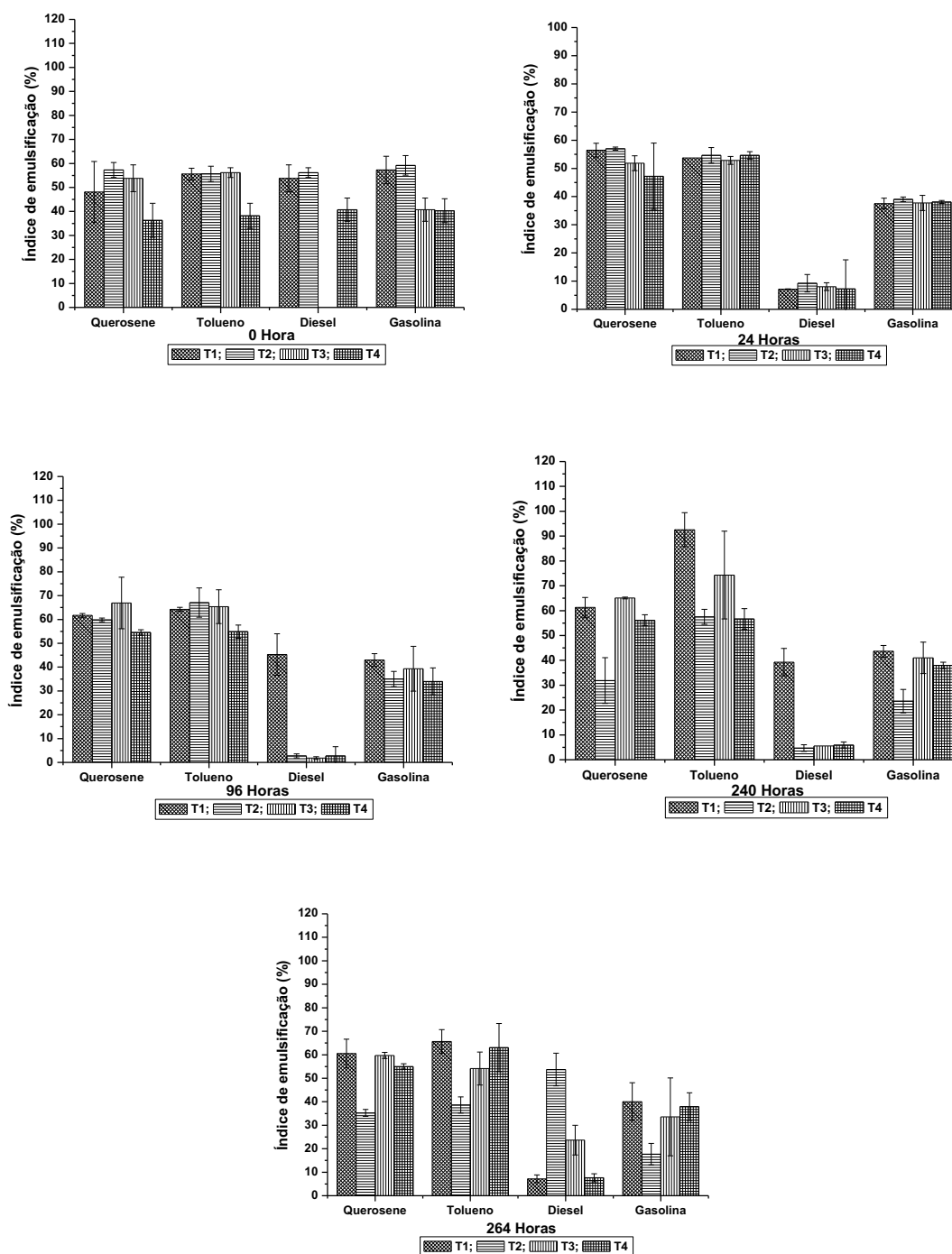


Gráfico 12 – Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações nos tempos de zero, 24, 96, 240 e 264 horas

Tabela 23 - Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações a zero hora

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)	Tempo (0 hora)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	Querosene	48,10±2,68	57,26±3,13	26,78±6,39	36,29±7,12	57,25 ^B
	Tolueno	55,58±2,42	55,66±3,18	85,62±3,69	38,16±5,12	58,76 ^A
	Diesel	53,79±5,57	56,17±2,02	63,49±8,17	40,72±4,8	0 ^{AB}
	Gasolina	57,26±5,69	59,20±4,08	49,85±9,24	40,30±4,96	44,08 ^B
	M	42,11 ^a	44,85 ^a	37,67 ^a	39,19 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Tabela 24 - Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações a 24 horas

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)	Tempo (24 hora)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	Querosene	56,44±2,45	57,00±0,56	51,85±2,61	47,22±1,78	51,17 ^B
	Tolueno	53,70±0,00	55,66±2,74	52,84±1,41	54,62±1,30	53,96 ^A
	Diesel	42,85±0,60	40,74±7,61	41,96±9,34	42,72±0,42	42,06 ^{AB}
	Gasolina	37,52±1,92	39,04±0,82	37,73±2,66	38,09±0,51	38,96 ^B
	M	47,63 ^a	47,83 ^a	46,10 ^a	45,66 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Tabela 25 - Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações a 96 horas

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)	Tempo (96 hora)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	Querosene	61,68±0,81	59,81±0,79	66,90±0,80	54,53±1,16	58,33 ^B
	Tolueno	64,22±0,83	67,08±6,14	65,37±7,06	54,90±2,77	64,59 ^A
	Diesel	45,28±8,70	2,72±3,85	1,81±2,57	2,72±3,85	4,57 ^{AB}
	Gasolina	42,96±2,67	35,00±3,17	39,34±9,40	34±5,65	43,29 ^B
	M	53,53 ^a	41,15 ^a	43,36 ^a	36,53 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Tabela 26- Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações a 240 horas

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)	Tempo (240 hora)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	Querosene	61,32±4,00	31,87±9,17	65,06±0,34	56,11±2,22	46,29 ^B
	Tolueno	92,56±6,83	57,48±3,01	74,30±7,65	56,65±4,18	70,60 ^A
	Diesel	39,28±0,50	4,71±1,33	5,55±0,00	5,93±1,19	22,77 ^{AB}
	Gasolina	43,64±2,32	23,60±4,70	40,99±6,30	37,96±1,30	33,47 ^B
	M	59,20 ^a	29,41 ^a	46,47 ^a	39,16 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Tabela 27- Índice de emulsificação do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual, em diferentes concentrações a 264 horas

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)	Tempo (264 hora)	TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	M
	Querosene	60,53±6,10	35,24±1,45	59,70±1,31	55,00±1,13	53,46 ^B
	Tolueno	65,64±5,06	38,63±3,46	54,14±27,01	63,04±0,25	50,65 ^A
	Diesel	7,19±1,64	53,70±6,95	23,63±36,31	7,61±1,72	20,82 ^{AB}
	Gasolina	40,02±8,03	17,68±4,56	33,57±16,58	37,93±5,90	27,38 ^B
	M	43,35 ^a	36,31 ^a	42,76 ^a	40,90 ^a	

NOTA – M= média; valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de 95% confiança; e valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em nível de confiança de 95%. São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Em trabalho desenvolvido por Bueno (2008) o melhor índice de emulsificação foram de 48,8%, em 72 horas de fermentação. Segundo o mesmo autor, o crescimento celular é diretamente proporcional a produção de biosurfactante e, este por sua vez, esta relacionado com a diminuição tanto da tensão superficial como da redução do índice de emulsificação.

Lima (2007) em estudo com *Pseudomonas aeruginosa* PALR, em meio contendo óleo de soja residual, levedura cervejeira residual e compostos inorgânicos, encontrou índice de emulsificação de 100%, e que menores concentrações de óleo de soja residual e nitrato geram maiores índices de emulsificações. O mesmo foi observado neste trabalho no tratamento 3 (com óleo de soja residual) com melhor índice de emulsificação, 1,5%.

Em trabalho desenvolvido por Monteiro et al., (2007) com cepa de *Pseudomona aeruginosa* UFPEDA 614, utilizando como fonte de carbono o glicerol, obteve índice de emulsificação para tolueno de 86,4% e, de 60 a 70% para os hidrocarbonetos como gasolina, querosene e diesel (NISTSCHE et al., 2005b), valores semelhantes ao encontrado neste trabalho.

Em trabalho desenvolvido por Meira (2007) com biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 614), foram verificados índices de emulsificação de 83% 75% 77% e 44% quando utilizado gasolina, óleo diesel, tolueno e querosene, respectivamente, ou seja, apresentaram valores menores para o tolueno, diferente do encontrado neste trabalho.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DA CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE

4.7.1 Volume da Espuma

Foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos valores médios do volume da espuma entre os tratamentos e nos resultados do período de fermentação. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice B – Tabela 21B).

Entre os tempos houve estabilidade do volume de espuma até 15 minutos em todos os tratamentos, na sequência houve decréscimo na maioria dos tratamentos, com exceção do 3 (1,25g de Biosurfactante e 20 g de Clara de Ovo) com redução após 45 minutos (Gráfico 13) (Tabela 29). Há indicação de que o biosurfactante tenha apresentado influência na manutenção do volume da espuma, devido sua ação na interface líquido-ar. Segundo Pavanelli et al., (1990), Santos (2008) os biosurfactantes auxiliam indiretamente na aeração da emulsão, pelo aumento da saturação da superfície do líquido, reduzindo a tensão superficial e facilitando as proteínas, presentes na emulsão, a envolverem as moléculas de ar.

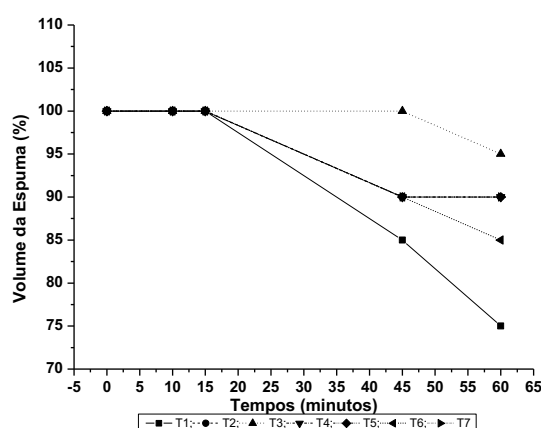


Gráfico 13 – Volume da espuma entre os tempos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

Tabela 29 – Volume da espuma da emulsão da clara de ovo com biosurfactante

VOLUME DA ESPUMA (%)	Tempo (minutos)	TRATAMENTOS							Média
		1	2	3	4	5	6	7	
	0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100,0
	10	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100,0
	15	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100,0
	45	85±0,0	90±0,0	100±0,0	90±0,0	90±0,0	90±0,0	90±0,0	90,7
	60	75±0,0	90±0,0	95±0,0	90±0,0	90±0,0	85±0,0	90±0,0	87,8
	Média	92,0	96,0	99,0	96,0	96,00	95,00	96,00	

NOTA – M= média; São apresentados os valores médios das triplicatas de cada tempo e respectivo desvio padrão.

Segundo Sikorski (2007); Liang e Kristinsson (2007) biosurfactantes com valores de pH abaixo de 6,0 aumentaram a capacidade de formação de espuma em emulsões.

Segundo a superfície de resposta os tratamentos com maior concentração de biosurfactante tiveram maiores influencia no volume da espuma da emulsão de clara de ovo com biosurfactante (Figura 17).

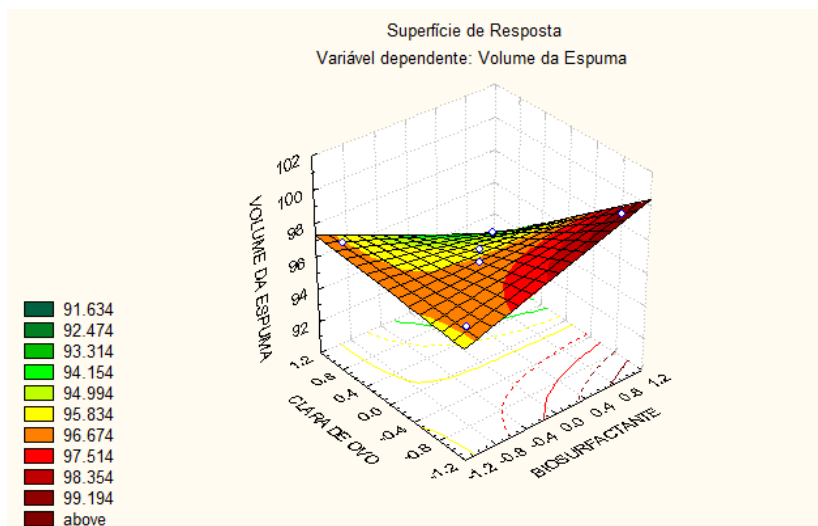


Figura 17 – Superfície de resposta do volume da espuma entre os tratamentos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações

4.7.2 Estabilidade da Emulsão: Índice de Sedimentação (IS)

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores do índice de sedimentação, entre os tratamentos. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice B – Tabela 30B).

O menor índice de sedimentação foi verificado no tratamento 3 (1,25g de biosurfactante e 20g de clara de ovo), 74,7% e, os maiores índices de sedimentação foram verificados nos tratamentos 1 (1,25g de biosurfactante e 35 g de clara de ovo), 5 (0,75 g de biosurfactante e 30 g de clara de ovo), 6 (0,75 g de biosurfactante e 30 g de clara de ovo) e 7 (0,75g de biosurfactante e 30 g de clara de ovo) com valores de 83,2%, 85,3%, 89,7%, 87,2%, respectivamente (Gráfico 14).

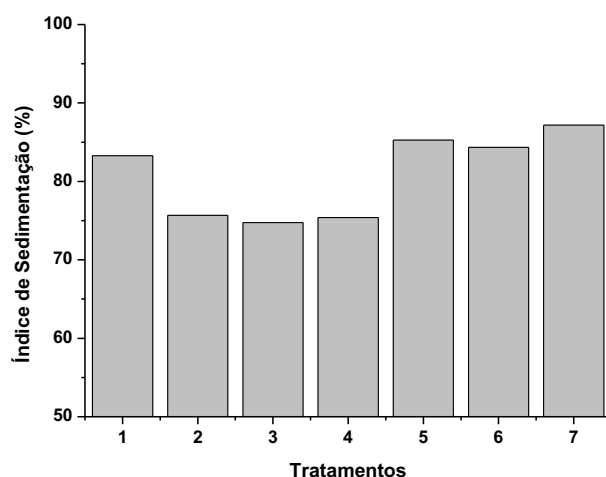


Gráfico 14 – Estabilidade da emulsão sobre o índice de sedimentação em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

De acordo com Van Aken (2004) as emulsões estabilizadas por proteínas se tornam mais estáveis, sendo capaz de formar camadas densas de adsorção, através de ligações intermoleculares que as unem fortemente. Segundo Xiong (1997) outra característica das proteínas, é a capacidade de retenção de água quando submetidas ao processo de centrifugação. No entanto, neste trabalho este aspecto foi contrário, ou seja, quanto menor a concentração protéica maior foi o índice de sedimentação, caracterizando baixo potencial protéico para a retenção de água da emulsão.

Valores menores no índice de sedimentação foram encontrados por Granato (2009), 6,4%, ao produzir suco de goiaba com proteína de soja.

Segundo a análise de superfície de resposta, os tratamentos com maior concentração de biosurfactante influenciaram nos resultados dos índices de sedimentação (Figura 18).

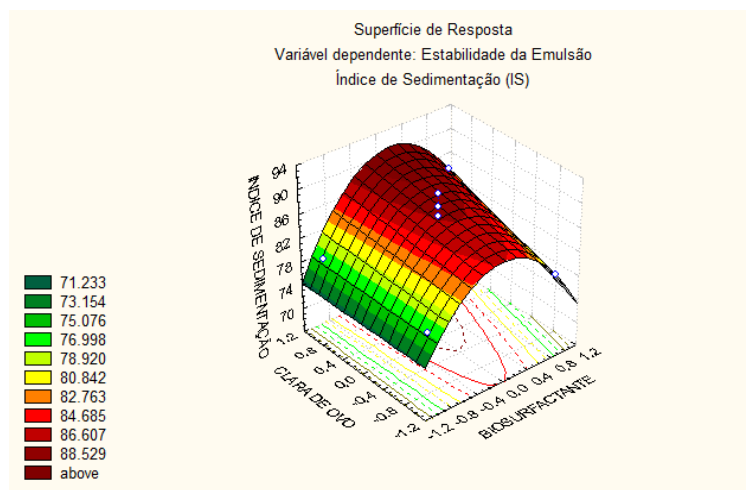


Figura 18 – Superfície de resposta da estabilidade da emulsão sobre o índice de sedimentação em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

4.7.3 Estabilidade da Emulsão: Capacidade de Retenção de Água (CRA)

Foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos valores da capacidade de retenção de água, entre os tratamentos. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice B – Tabela 31B).

Os tratamento 4 (0,5 g de biosurfactante e 20 g de clara de ovo) e 2 (0,5 g de biosurfactante e 35 g de clara de ovo), apresentaram maiores capacidades de retenção de água, 28,9% e 26,6%, respectivamente (Gráfico 15). Esse fato pode estar relacionado à baixa concentração de biosurfactante, ou seja, não auxiliando as proteínas da emulsão na capacidade de retenção da água.

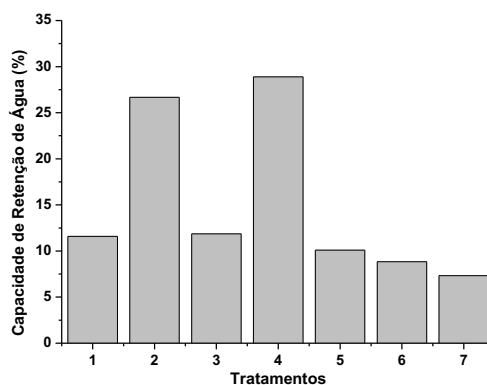


Gráfico 15 – Estabilidade da emulsão – capacidade de retenção de água em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

Valores superiores na capacidade de retenção de água foram apresentados por Granato (2009), em trabalho envolvendo proteína (lecitina) de soja e suco de goiaba aplicado em sobremesas, com porcentagens que variaram de 87,3% a 100%.

Segundo a análise de superfície de resposta, a clara de ovo apresentou influência direta na capacidade de retenção de água na emulsão, em todos os tratamentos (Figura 19).

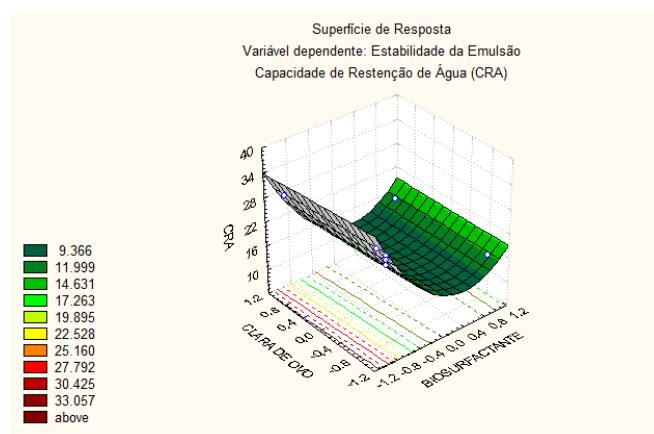


Figura 19 – Superfície de resposta da estabilidade da emulsão sobre a capacidade de retenção de água em emulsão de clara de ovo com biossurfactante em diferentes concentrações

Roman (2005) encontrou uma capacidade de retenção de água em hidrolisados enzimáticos de 2,4g de água por grama de proteína quando o grau de hidrólise foi de 5,7%.

A capacidade de retenção encontrada neste trabalho mostrou-se inferior a encontrada por Antunes (2003), que encontrou valores de 73,04% na capacidade de retenção de água em géis de concentrados protéicos de soro de leite, quando submetido a 9% de proteína, a uma temperatura de 83°C, pH de 4,3, durante 18 minutos.

4.7.4 Sinérese

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores de sinérese, entre os tratamentos. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice B – Tabela 32B).

O tratamento 6 (0,75g de biosurfactante e 30g de clara de ovo) e 3 (1,25g de biosurfactante e 20g de clara de ovo) apresentaram maior e menor sinérese, 47,57% e 33,3%, respectivamente (Gráfico 16). Os resultados sugerem que o biosurfactante possa ter auxiliado as proteínas da clara de ovo, proporcionando menor percentual de água liberada, ou seja, reduzindo a sinérese da emulsão. Segundo Verbeken; Thas; Dewettinck (2004) os estabilizantes interagem com a proteína de soja, água, lipídeos e outros compostos minoritários, o que proporciona uma maior viscosidade, prevenindo a sinérese pela imobilização da água da matriz.

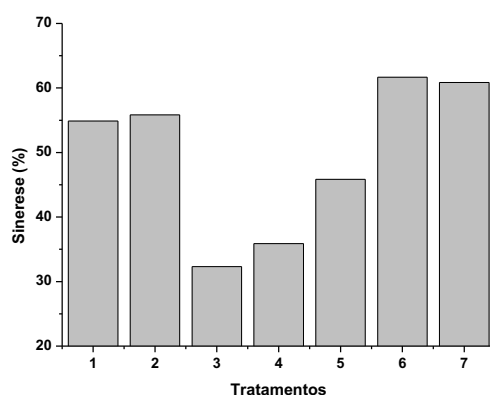


Gráfico 16 – Sinérese em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

Segundo a análise de superfície de resposta a clara de ovo apresentou maior significância nos resultados da sinérese da emulsão (Figura 20).

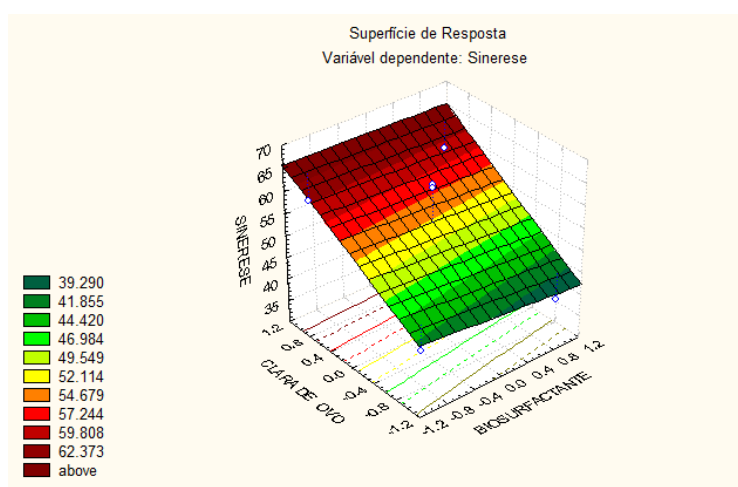


Figura 20 – Superfície de resposta da sinérese em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

4.7.5 Solubilidade do nitrogênio

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores da solubilidade, entre os tratamentos. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice B – Tabela 33B).

A solubilidade do nitrogênio obteve variação de 26,6% entre os tratamentos, sendo que os tratamento 4 (0,5 g de biosurfactante e 20 g de clara de ovo) e 1 (1,25 g de biosurfactante e 35 g de clara de ovo) apresentaram $1,83 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,34 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Gráfico 17). Os resultados demonstram que emulsões com maior concentração de biosurfactante apresentam menor solubilidade do nitrogênio.

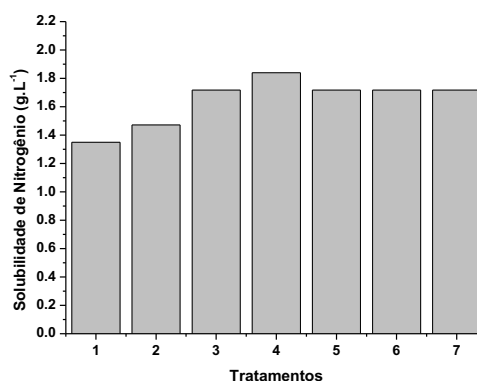


Gráfico 17 – Solubilidade de nitrogênio em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações

O teor de proteína, a albumina, age em sinergia com gomas, tendo influencia na estabilidade da espuma e vida de prateleira (CAMPBELL, MOUGEOT, 1999). A complexação da proteína é responsável pela sua distribuição ao redor das bolhas o que confere uma manutenção da tensão interfacial entre as fases gasosa e líquida, evitando fenômenos como coalescência (KOKINI, VAN AKEN, 2006; FOEGEDING et. al., 2006; GLASER et. al., 2007).

Glória (2000), em trabalho em trabalho desenvolvido com de torta desengordurada de castanha do Pará, encontrou solubilidade de nitrogênio de 98,73% a 10%, em pH 12 e 3, respectivamente.

Pelegrine (2003) em trabalho sobre a solubilidade das proteínas da clara ovo em função da temperatura e do pH, verificou que valores de pH próximos a neutralidade (6,0-6,3) reduzem a solubilidade, obtendo solubilidade de 100%, 68% em pH de 9 e 6 respectivamente.

Santos (2008) em trabalho desenvolvido sobre as propriedades funcionais de proteínas da clara do ovo de codorna, encontrou valores maiores para solubilidade, ou seja, 98,92g/100g a 68,35g/100g, mostrando a relação com o pH de 10 e 3, respectivamente.

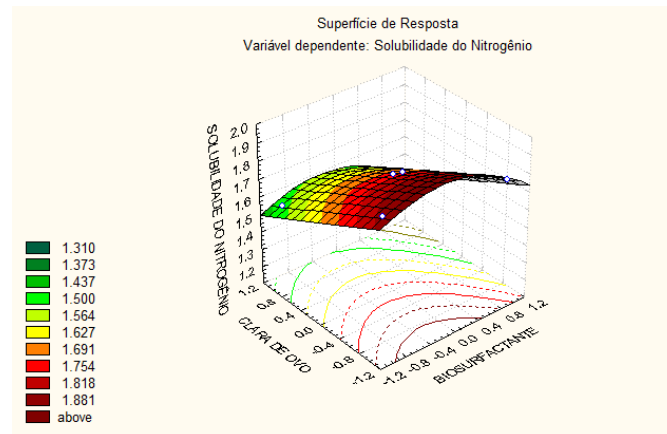


Figura 21 – Superfície de resposta da solubilidade do nitrogênio em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

4.7.6 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos valores de pH, entre os tratamentos. O teste F corrobora com os valores de p (Apêndice B – Tabela 34B).

Os valores de pH variaram de 6,69 a 9,5 entre os tratamentos, com diferença de 29,6% (Gráfico 18). Portanto, conduzindo a uma redução na atividade tensoativa, dificultando a manutenção da estabilidade da emulsão, conforme verificado no item 4.7.3.

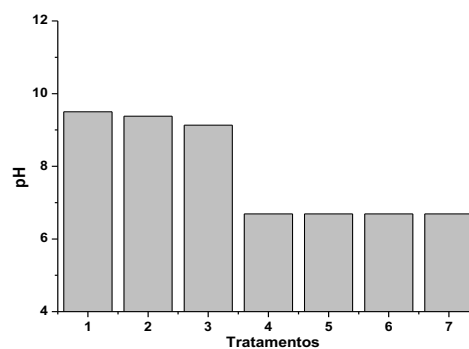


Gráfico 18 – Potencial hidrogeniônico (pH) em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações

Segundo Chavez-Montes et al. (2006) emulsões contendo albumina em concentrações de 1%, pH 5,0 e o uso de hidrocoloides, tem como consequência o aumento da estabilidade da espuma. Considerando este aspecto, foi observado dificuldade na estabilização da espuma, item 4.8.2 e 4.8.3, devido a valores de pH acima de 5,0, confirmando os resultados verificados por Glaser et al., (2007).

Segundo a superfície de resposta ambas as variáveis, clara de ovo e biosurfactante, influenciaram nos resultados do pH (Figura 22).

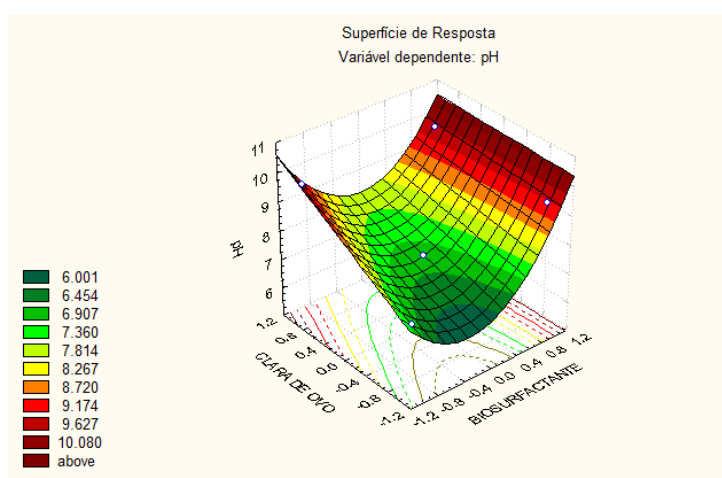


Figura 22 – Superfície de resposta do pH em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

5 CONCLUSÃO

As cepas *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) apresentaram biosurfactante com maiores características de emulsificação.

Fermentados com adição de glicerol apresentaram maior produção e produtividade de biomassa, consumo de açúcar e conversão de açúcar em biosurfactante. Maior produtividade de biosurfactante, conversão de açúcar em biosurfactante e biosurfactante com maior índice de emulsificação e redução na tensão

superficial foram observadas nos tratamentos com adição de óleo de soja residual. Fermentados com adição de glicerol e óleo de soja residual apresentaram maior produção de biosurfactante. No entanto, fermentados sem adição de glicerol e óleo de soja residual, tiveram maior consumo de açúcar e menor produção e produtividade de biomassa e biosurfactante.

As emulsões, de clara de ovo com biosurfactante, mostraram que a clara de ovo teve maior influência nos resultados da estabilidade da emulsão, tanto da retenção de água quanto do índice de sedimentação e, na sinérese. O biosurfactante apresentou maior influência nos resultados do volume da espuma e na solubilidade de nitrogênio da emulsão. Portanto, emulsões com baixo teor protéico mostraram maior índice de sedimentação; altas concentrações de biosurfactantes apresentaram menor sinérese e solubilidade de nitrogênio e, maior volume da espuma e retenção de água; valores altos do pH dificultaram na estabilidade da emulsão.

Considerando todos esses aspectos a inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em meio de cultivo com glicerol e óleo de soja, promoveu maior produção de biosurfactante. A aplicação desse biosurfactantes pode ser utilizado para ampliar a estabilidade de emulsões com clara de ovo. No entanto, sugere-se o aumento da concentração de biosurfactante na emulsão, para ampliar o volume e estender sua estabilidade.

CONSIDERAÇÕES

No decorrer deste trabalho, foram percebidas algumas dificuldades, no que diz respeito à produção em grande quantidade de biosurfactante e a falta de referências de trabalhos anteriores que aplicaram o biosurfactante na área alimentícia.

Dentro deste contexto, destaca-se a produção de trabalhos futuros, utilizando biosurfactante produzido e a aplicação em produtos alimentícios aerados.

REFERÊNCIAS

AHN, D. U.; KIM, S. M.; SHU, H. Effect of egge size and strain age of hens on the solids content of chicken eggs. **Poultry Science**, London, v. 76, p. 914-919, 1997.

AKBAR, M.K.; GAVORA, J.S.; FRIARS, G.W. et al. Composition of eggs by commercial sizes categories: Effects of genetic group, age, and diet. **Poultry Science**, v.62, n.6, p.925- 33, 1983.

ALLEONI, A.A.C.; ANTUNES, A.J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha sob refrigeração. **Scientia Agrícola**, v.58, n.4, p.681-685, 2001.

ALTSCHUL, A. M.; WILCKES, H. L. New Protein Foods. **Food Science and Technology**. Academic Press, Orlando, Florida, 1985.

ANTUNES, A. E. C.; Motta, E. M. P.; ANTUNES, A. J.; Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 23, p. 183-189, 2003.

ANZAI, Y., KIM, H., PARK, J.-Y., WAKABAYASHI, H. & Oyaizu, H.. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50, p. 1563–1589, 2000.

ARAUJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2ª ed. Viçosa: UFV, p.416, 1999.

ARAUJO, L.F.; GOMES, G.A.; ALMEIDA, E.G.; ARAUJO, C.S.S.; JUNQUEIRA, O.M.; FARIA, D.E. **Utilização do ácido linoléico conjugado e de diferentes fontes de óleo na dieta de frangos de corte na fase inicial**. Trabalhos de Pesquisa. Campinas: FACTA, p. 38, 2004.

ARIMA K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G.; SURFACRIN, A crystalline peptidelipid surfactante produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of Fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.31, n.3,1968.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G.; Biochem. Biophys. **Res. Commun.**, v. 31, p. 488, 1968.

Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G.; *German Patent O*, v. 1, p. 903,987, 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.

BARIGOU, M. Solid-Liquid Mixing. In: Food Mixing: **Principles and Applications**. Wiley-Blackwell, p. 292, 2009.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresorce Technology, Essex**, v. 95, p.15-18, 2004.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C. BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da cmc de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry. 4th revised and extended Edition. **Springer-Verlag**, p. 1070, 2009.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)-Portaria nº 540 – SVS/MS de 27 de outubro de 1997. Disponível em <www.abima.com.br/dload/13_1_port_540_97_leg_alim_nac.pdf> Acesso em 25 de agosto, 2011.

BRANDALISE, V. H. Influência da nutrição da matriz, sobre a performace do frango de corte. In: Encontro técnico em ciências aviárias, 5, 2001, Uberlândia. Anais...Uberlândia, 2001, p. 46.

BROWN, A. Understanding Food: principles & preparation. 3d ed. **Thomson Learning, Inc.**, p. 619, 2008.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 99 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2008.

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

CAMEOTRA, S.S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipidbiosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial CellFactories**, v. 8, p.16, 2009.

CAMPELL, G.M.; MOUGEOT, E. Creation and characterization of aerated food products. **Trends in Food Science & Tecnology**, v.10, p.283-296, 1999.

CAMPOS-GARCÍA, J.; CARO, A.D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase Vich is specifically involved in rhamnolipid síntesis. **J. of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p.4442-4451, 1998.

CAPITANI, C. D. **Interação de proteínas do soro de leite com polissacarídeo: fracionamento e estudo das propriedades funcionais dos complexos**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CARVALHO, F.B.; STRINGHINI, J.H.; JARDIM FILHO, R.M.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; DEUS, H.A.S.B. Qualidade interna e da casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 8, p. 25-29, 2007.

CHAVEZ – MONTES, B.E.; Choplin, L.; SCHAER, E. Reological carachterization of wet food foams. **Journal of Texture Studies**, v. 38, p. 236-252, 2007.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de Bacillus subtilis em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2005.

COTTA, T. **Reprodução de galinha e produção de ovos**. Lavras: UFLA-FAEPE, p.124, 1997.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v. 30 p. 179, 2002.

CRISTOFI, N., IVSHIRA, I.B. Microbial and their use in field studies of soil remediation. **Journal Applied Microbiology**. V.93, p.915-929, 2002.

CRUZ, A. J. G. **Produção de biossurfactante a partir de Co-produto da indústria de biodiesel**. São Carlos, 2009.

CULBERTSON, J. D. Food Protein Functionality. In: **Handbook of Food Science, Technology and engineering**. Taylor and Francis Group., v.1, p. 1000, 2006.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coating. In: **Edible Films and Coating for Food Applications**. Springer **Science+Business Media**, LLC., p. 403, 2009.

DARLING D. F.; BIRKETT, R. J. Food colloids in practice. In: **Food Emulsions and Foams**. E. Dickinson, ed. R. Soc. Chem., London, United Kingdom, 1986.

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

DASARI M. A., KIATSIMKUL P. P., SUTTERLIN W R, SUPPES G. J.; Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis a-General**, v.281 p. 225-231, 2005.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

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

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25–39, 2003.

DOGGET R.G. *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. New York: **Academic Press**, 1979.

DOSSIÊ EMULSIFICANTES FOOD INGREDIENTS BRASIL N° 7- 2009. p. 64. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/89.pdf>>. Acessado em: 30 out. 2011.

DUARTE, M. S.; **Caracterização de bactérias produtoras de ramnolípeios isolados de poços de petróleo.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos. Recife, 2003.

DUBOIS, M. G. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

FOEGEDING, E.A.; LUCK, P.J.; DAVIS, J.P.; Factors determining the physical properties of protein foams. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.284-292, 2006.

GANESHALINGAM, S.; LEGGE, R.L.; ANDERSON, W.A. Surfactant enhanced leaching of polyaromatic hydrocarbons from soil. **Process Safety and Environmental Protection**, v.72, p. 247-251, 1994

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65. 1992.

GLASER, L.A.; PAULSON, A.T.; SPEERS, R.A.; YADA, R.Y.; ROUSSEAU, D. Foaming behavior of mixed bovine serum albumin-protamine system. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.495-506, 2007.

GLORIA, M.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Para: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, 240-245, 2000.

GRANATO, DANIEL. **EMULSÃO DE SOJA E GOIABA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, CROMÁTICA, SENSORIAL E DE ESTABILIDADE,** Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2009.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 301-305, 1984.

GUZEY, D; MCCLEMENTS, D. Influence of Environmental Stresses on O/W Emulsions Stabilized by b-Lactoglobulin–Pectin and b-Lactoglobulin–Pectin–Chitosan Membranes Produced by the Electrostatic Layer-by-Layer Deposition **Technique**. Springer Science+Business Media, 2006.

HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. Microbial production of surfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 18, p. 41-57, 1996.

HEIMAN, V.; CARVER, J.S. The albumen index as a physical measurement of observed egg quality. **Poultry Science**, v.15, p.141-148, 1936.

HOLMBERG, K.; *Curr. Op. Colloid Interf. Sci.*, v.6, n. 2, p. 148–159, 2001.

HOLTS, W. F.; ALMQUIST, H.J. Measurement of deterioration in the stored hen's egg. **United States Egg Poultry Magazine**, v.38, p.70, 1932.

IBANOGLU, E., ERÇELEBI, E. A. Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. **Food Chemistry**, v.101, p.626–633, 2007.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz. São Paulo, 1995.

INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. Dictionary of Food Science & Technology. 2. ed. Wiley-Blackwel. 2009.

ITOH, S.; H. HONDA, F.; TOMITA, and SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-parafin (C12, C13 and C14 fractions). **J. Antibiotics**, v. 12, p. 855-859, 1971.

IZQUIERDO, P. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 18, p. 26–30, 2002.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glycol-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. of the Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KAKINUMA, A.; HORI, M.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K.; *Agric. Biol. Chem.*, v. 33, p. 971-976, 1969

KAKINUMA, A.; OUCHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; HORI, M.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K.; *Agric. Biol. Chem.*, v. 33, p. 971, 976, 1669, 1969.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; *J. Ferment. Bioeng.*, v. 84, p. 41, 1997.

KIOSSEOGLOU, V.; PARASKEVOPOULOU, A. **Eggs**. In: Bakery Products: science and technology. Hui, H. Y. Blackwell Publishing, p. 576, 2006.

KHOURYIER, H. A.; ARAMOUNI, F. M; HERALD, T. J. Physical, chemical and sensory properties of sugar-free jelly, Manhattan. *Journal of Food Quality*, Westport, v. 28, n. 2, p. 179-190, 2005.

KOKINI, J.; VAN AKEN, G.; Discussion session on food emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, v.20, p.438-445, 2006.

KOSARIC, N. Biosurfactants ad their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 39 (4): 295-304, 2001.

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

KOSARIC, N.; REHM, H.-J.; REED, G. **Biosurfactantes**. Biotechnology, 1996.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D.; *J. Colloid Interface Sci.*, v. 1, p. 204, 1998.

KUROPATWA, M.; TOLKACH, A. KULOZIK, U. Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.2174–2181, 2009.

LANG S, WULLBRANDT D. Rhamnose lipids biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.51, p.22–32, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science I**, p. 1-9, 2002.

LARBIER, M., LECLERCQ, B. Nutrition and feeding of poultry. **Nottingham**, p.178-183, 1992.

LAU, C. K.; DICKINSON, E. Microstructural evolution during thermal processing of a high-sugar aerated system stabilized by food proteins. In: Gums and Stabilisers for the Food Industry 13. **The Royal Society of Chemistry**, p. 495, 2006.

LEE, K.M.; HWANG, S.H.; HA, S.D.; JANG, J.H.; LIM, D.J.; KONG, J.Y. Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 267-273, 2004.

LIANG, Y.; KRISTINSSON, H. G. Structural and foaming properties of egg albumen subjected to different pH-treatments in the presence of calcium ions. **Food Research International**, v.40, p.668–678, 2007.

LI-CHAN, E.; POWRIE, W. D; NAKAI, S. **The chemistry of eggs and egg products**. In. W. J. STADELMAN; O. J. COTTERILL (Ed) Egg Science and Technology. Haworth Press, Inc.1994. Cap.6, p.105-176.

LIMA C. J. B.; SÉRVULO E. F. C.; CARDOSO V. L.. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biosurfactante. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 73 - 79, jan. - dez. 2007.

LIMA, C. J. B. **Produção de Biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2007.

LIMA, C. J. B.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biosurfactante. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 73 - 79, jan. - dez. 2007.

LIN, S. C.; GOURSAUD, J. C.; KRAMER, P. J.; GEORGIU G.; SHARMA, M. M. Em Microbial Enhancement of Oil Recovery Recent Advances; Donaldson, E. C., ed.; **Elsevier Science Publishers**: Amsterdam, 1990.

LIN, S. C.; GOURSAUD, J. C.; KRAMER, P. J.; GEORGIOU G.; SHARMA, M. M. Em *Microbial Enhancement of Oil Recovery Recent Advances*; Donaldson, E. C., ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1990.

LOBO, L. Role of surfactants in emulsification: Coalescence vs. rupture. **Papers American Chemical Society**, v. 219, p. 562, 2000.

LOBO, L.; SVEREIKA, A. Coalescence during emulsification 2. Role of small molecule surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, p. 498–507, 2003.

LOMAKINA K.; MIKOVA K.; A study of the factors affecting the foaming properties of egg white : a review. **Czech journal of food sciences** Y., vol. 24, No. 3, pages 110-118, 2006.

MAKKAR, R. S. CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two Bacillus strain at thermophilic conditions. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v.74, n. 7, p. 887-889, 1997.

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

MAPA. Decreto n. 56585 de 20 de julho de 1965. Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização do ovo, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 1965.

MARQUÉS A.M.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M.J. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 158, p. 110–117, 2009.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions; principles, practice, and techniques. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.

MEDEIROS, S. I. G.; COSTA, M.; MARQUES, N. N.; BORGES, M. R.; GIRÃO, J. H. S.; GARCIA, R. B. Obtenção de éster de açúcar e seu uso como aditivo em fluido de perfuração a base água. 4º PDPETRO, Campinas, 2007.

MEIRA J.A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos.** Masters dissertation, Universidade Federal do Paraná. 2007

MERCADÉ, M.E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M. J.; DEANDRES, C. and GUINEA, J.; Olive oil mil effluente (Oome) – new substrate for biosurfactant production. **Biores. Technology**, v. 43, p.1-6, 1993.

MESQUITA, A. C. **Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes.** Dissertação (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.

MINE, Y. Recent advances in the understanding off egg white protein functionally. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 7, p. 25-232, 1995.

MINE, Y.; D’SILVA, I. Bioactive components in egg white. In: Egg **Bioscience and Biotechnology**. Mine, Y. John Wiley & Sons Inc., p. 307, 2008.

MONTEIRO, S. A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonasaeruginosa* UFPEDA 614.** Dissertação (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; DE SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and Structural Characterization of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.

MORENG R. E., AVENS J. S. **Anatomia e fisiologia das aves.** Ciência e produção de aves. Tradução Nair Massako Katayma Ito. São Paulo: Roca, 1990. cap. 3, p. 43-75.

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.; YOUNG, R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, p. 111-125, 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants, **Environ. Pollut.**, v.133 p.183-198, 2005.

NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O., CONTIERO, J. Rhamnolipids Surfactants: An Update on the General Aspects of these Remarkable Biomolecules, **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.

NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O., HADDAD, R., GONÇALVES, L. A. G., EBERLIN, M., CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

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

NUSSINOVITCH, A. **Hydrocolloids applications**: Gum technology in the food and other industries. London: Blackie Academic and Professional, 1997, p. 156–158.

OCHSNER, U.A.; HEMBACH. T., FIECHTER. A. Production of rhamnolipid biosurfactants. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 53, p. 90-118, 1995.

OLIVEIRA, G.E. **Influência da temperatura de armazenamento nas características físico – químicas e nos teores de aminos bioativas em ovos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

OSHODI, A.A.; OJOKAN, E. O. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate, **Food Chemistry**, p. 59, 1997.

ORDÓNEZ, J.A. Ovos e produtos derivados. In:**Tecnologia de alimentos**. Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmedp., p. 269-279, 2005.

PALLERONI N.J. Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections-Systematic bacteriology. New York, v. 9, p. 1091-108, 1998.

PARSONS, C.H.; MINK, L.D. Correlation of methods for measuring the interior quality of eggs. **United States Egg Poultry Magazine**, v.43, p.484-489, 1937.

PAVANELLI, A. P.; CICHELO, M. S.; PALMA, E. J. Emulsificantes como agentes de aeração em bolos, Oxiteno S/A Indústria e Comércio, 2000.

PELEGRINI, D. H. G.; GASPARETO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas da clara de ovo em função da temperatura e do pH. **Ciências Exatas e Naturais**, Campinas, v.5, n.2, jul/dez 2003.

PEREIRA P. H. F.; SILVA M. L. C. P. da; Estudo da adsorção de surfactante catiônico na matriz inorgânica fosfato de nióbio hidratado. **Quím. Nova**, v.32, n.1, 2009.

PEREIRA, P. H. F.; SILVA M. L. C. P. Estudo da adsorção de surfactante catiônico na matriz inorgânica fosfato de nióbio hidratado. **Quím. Nova**, v.32 n.1, 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Rio Claro, 2006.

POLLACK M. *P. aeruginosa*. In: Mandell DaB. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York: Churchill Livingstone. v.5, p. 2310-35, 2000.

PRINCE, R. C.; **Crit. Rev. Microbiol.**, v.19, p. 217, 1993.

RAHMAM, K. S.; RAHMAM, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Program**, v. 18, p. 1277 – 1281, 2002.

RAHMAN K.S.M. et. al. Biorremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litte, coir pith and rhaminolipid biosurfactant. **Bioresource technology**, v. 81, p.25-32, 2002.

RAIKOS, V.; CAMPBELL, L.; EUSTON, S. R. Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. **Food Research International**. v.40, p. 347–355, 2007.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113–116, 2004.

REMEUF, F. *et al.* Preliminary observations on the effects of milk fortification and **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, p. 41-57, 1996.

REMEUF, F. *et al.* Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 773–782, 2003.

ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína, v.18, n.1, p.75-83, 2005.

ROMERO, A. *et al.* Rheology and droplet size distribution of emulsions stabilized by crayfish flour. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 1033-1043, 2008.

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

ROSE, S.P. Principles of Poultry Science. New York: **CAB international**, p.135 , 1997.

ROSSI, M.; POMPEI, C. Changes in some egg components and analytical values due to hen age. **Poultry Science**, v.74, p.152-160, 1995.

RUBINOVITZ C, GUTNICK DL, ROSEMBERG E. Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. **Journal of Bacteriology**, p. 126-132, 1982.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA. JR N.; ALVES, T.L.M.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.19, p. 159-166, 2002.

SANTANA FILHO, A. P. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: estudos de produção e de variação da composição de homólogos.** 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

SANTOS, A. S., SAMPAIO, A. P., VASQUEZ, G. S., SANTA ANNA, L. M., REIRE, D. M. G., Evaluation of diferente carbono sources in production of rhamnolipis by a train *Pseudomona aeruginosa*. **Applied. Bioch. An Biotechnol.**, p. 98-100, 2002.

SANTOS, D.O. **Propriedades funcionais de proteínas da clara do ovo de codorna**. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

SANTOS, S.A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. 109 f. Tese (Doutorado em Ciência Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. **Características dos ovos**. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES; Pró-reitoria de Extensão Programa Institucional de Extensão. Espirito Santo, 2007. Boletim Técnico – Agosto, 2007.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier Obtained from a New Strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 400-406, 2006.

SGRBIRRI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo: Varela, p. 57-172, 1996.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactant. **Indian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 165-184, 1995.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **J Biotechnol**, v. 40, p. 207–217, 1995.

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

SIKORSKI, Z. E. The Role of Proteins in food. In: **Chemical and Functional Properties of Food Components**. 3d ed. Taylor & Francis Group, LLC., p. 532, 2007.

SILVA, W.O.; TAPIA, Y.I.P.; **Produção de biosurfactantes**. Projeto de Graduação. Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2002.

SILVERSIDES, F.G.; SCOTT, T.A. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. **Poult. Sci.**, v. 80, p. 1240-1245, 2001.

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

SMITH, R.D.; IGLEWSKI, B.R. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 56-60, 2003.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SOLER, M. P.; VEIGA, P. G. Especial: Sorvetes. Série publicações técnicas do centro de centro de informação em alimentos, n.1, 2001.

SOUZA, P.; SOUZA, H. B. A. DE; BARBOSA, J. C.; GARDINI, C. H. C.; NEVES, M. DAS. Effect of laying hens age on the egg quality maintained at room temperature. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 49-52, 1997.

SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F.. **Aves e ovos**. Pelotas: Editora da Universidade UFPEL, p. 137, 2005.

STADELMAN, W. J. **The Egg Industry: Egg Science and Technology**. New York: The Haworth Press, 1995.

STADELMAN, W.J.; COTTERILL, O.J. Egg science and technology. 2 ed. Westport: **Avi Publishing Company**, p. 323, 1997.

TALANSIER, E.; LOISEL, C.; DELLAVALLE, D.; DESRUMAUX, A.; LECHEVALIER, V.; LEGRAND, J. Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties. **Food Science and Technology**, v.42, p.496–503, 2009.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A.; **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 84, p. 917, 2000.

TORRES, E.A.F.S.; CAMPOS, N.C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M.L.; PHILIPPI, S.T.; MINAZZI-RODRIGUES, R.S. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. Disponível em: < http://www.bibvirt.futuro.usp.br/textos/hemeroteca/cta/vol20n2/cta20n2_3.pdf>. Outubro 2000. Acesso em: 24 out. 2005.

Trends in Food Science and Technology, v. 6, n. 7, p. 25-232, 1995.

VACLAVICK, V. A., CHRISTIAN, E. W. Essencials of Food Science. 3d ed. Springer **Science+Business Media**, LLC. 2008. 571p.

VADEHRA, D. V.; NATH, K. R. Eggs as a source of protein. **Crit. Rev. Food Technol.**, v.4, n.1, p. 193-308, 1973.

VAN AKEN, G. A.; BLIJDENSTEIN, T. B. J.; HOTRUM, N.E. Colloidal destabilization mechanisms in protein-stabilised emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, 2003, p. 371-379.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; **Biotechnol. Adv.**, v. 9, p. 241, 1991.

VERBEKEN D., THAS O., DEWETTINCK K. Textural properties of gelled dairy desserts containing κ -carrageenan and starch. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p.817–833, 2004.

VIEIRA, Rafael Bruno; CARDOSO, Vicelma Luiz. Produção de biosurfactante utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Disponível em:<www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/4121/3069> Acesso em: 09-10-2011.

WALSTRA, P. Dispersed Systems: Basic Considerations. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Drekker, Inc., p. 96-151, 1996.

WANG, G.; WANG, T. Effects of yolk contamination, shearing, and heating on foaming properties of fresh egg white. **Journal of Food Science**, v.74, n.2, p.147-156, 2009a.

WANG, G.; WANG, T. Improving foaming properties of yolk-contaminated egg albumen by basic soy protein. **Journal of Food Science**, v.74, n.8, p.581-587, 2009b.

WILDE, P. J.; CLARKE, D. C. Foam Formation and Stability. In: Methods of Testing Protein Functionality. **Blackie Academic & Professional**, p. 265,1996.

WILGUS, H.S.; WAGENEN, A. van. The height of the firm albumen as a measure of its condition. **Poultry Science**, v.15, p.319-321, 1936.

XIONG, Y. L. Structure-function relationships of muscle proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Eds.). **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker Inc, 1997, p. 341–392.

YAKUBU, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2735-2739, 2007.

YANG, X.; FOEGEDING, A. Effects of sucrose on egg white protein and whey protein isolate foams: factors determining properties of wet and dry foams (cakes). **Food Hydrocolloids**, v.24, p. 227-238, 2010.

ZAYAS, J. F. Functionality of Protein Food. **Springer-Verlag**, p. 373, 1997.

ZIEGLER, G. R. & FOEGEDING, E. A. The gelation of proteins. In Advances in Food Nutrition Research. Kinsela, J. E. (Ed.). **Academic Press, Inc**. v. 34, p. 203-298, 1990.

APÊNDICE A

Tabela 3A - Análise de variância aplicada à média dos valores de produção de biomassa em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²	
Produção de Biomassa		Glicerol	1,987788	1	1,987788	6,052972	0,039302	5,32	0,50	
	Tratamentos	Óleo de soja	0,013068	1	0,013068	0,039793	0,846863			
		Glicerol por								
		Óleo de Soja	0,666465	1	0,666465	2,02944	0,192096			
		Erro	2,627189	8	0,328399					
		Total	5,294511	11						
	Tempos	Regressão	0,529632	1	0,529632	0,487652	0,497279	4,67	0,03	
		Resíduo	14,11914	13	1,086087					
		Total	14,64877	14						

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 4A - Análise de variância aplicada à média dos valores de produtividade de biomassa em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²	
Produtividade de Biomassa		Glicerol	0,000111	1	0,000111	1,107593	0,323353	5,32	0,2	
	Tratamentos	Óleo de soja	1,19E-05	1	1,19E-05	0,118246	0,739808			
		Glicerol por								
		Óleo de Soja	8,22E-05	1	8,22E-05	0,817643	0,392286			
		Erro	0,000804	8	0,0001					
		Total	0,001009	11						
	Tempos	Regressão	0,001054	1	0,001054	1,947406	0,186247	4,67	0,1	3
		Resíduo	0,007035	13	0,000541					
		Total	0,008089	14						

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 7A - Análise de variância aplicada à média dos valores de produção de biosurfactante em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
Produção de Biosurfactante	Tratamentos	Glicerol	4,271179	1	4,271179	0,528975	0,487774	5,32	0,19
		Óleo de soja	4,45447	1	4,45447	0,551675	0,478874		
		Glicerol por Óleo de Soja	6,70089	1	6,70089	0,829888	0,388929		
	Tempos	Erro	64,59557	8	8,074447				
		Total	80,02211	11					
		Regressão	152,2153	1	152,2153	5,781659	0,031815	4,67	0,30
		Resíduo	342,2545	13	26,32727				
Total	494,4698	14							

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 8A - Análise de variância aplicada à média dos valores de produtividade de biosurfactante em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
Produtividade de Biosurfactante	Tratamentos	Glicerol	0,000534	1	0,000534	0,240319	0,637137	5,32	0,06
		Óleo de soja	7,92E-05	1	7,92E-05	0,035639	0,854964		
		Glicerol por Óleo de Soja	0,000572	1	0,000572	0,257663	0,625425		
	Tempos	Erro	0,01777	8	0,002221				
		Total	0,018955	11					
		Regressão	0,003631	1	0,003631	0,307126	0,588856	4,67	0,02
		Resíduo	0,153686	13	0,011822				
Total	0,157317	14							

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 11A - Análise de variância aplicada à média dos valores da concentração de açúcar (CAÇ) por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
		Glicerol	0,117081	1	0,117081	0,004127	0,950355	5,32	0,002
CAÇ	Tratamentos	Óleo de soja	0,28707	1	0,28707	0,010119	0,92235		
		Glicerol por							
		Óleo de Soja	0,063523	1	0,063523	0,002239	0,963419		
		Erro	226,9628	8	28,37035				
	Total	227,4305	11						
	Regressão	38,70756	1	38,70756	0,879865	0,36534	4,67	0,06	
Tempos	Resíduo	571,9038	13	43,9926					
	Total	610,6113	14						

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 13A - Análise de variância aplicada à média dos valores da eficiência de conversão de açúcar em biomassa (ECAÇBM) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
		Glicerol	3572,806	1	3572,806	2,237263	0,1730843	5,32	0,36
ECAÇBIM	Tratamentos	Óleo de soja	3582,121	1	3582,121	2,243095	0,1725882		
		Glicerol por							
		Óleo de Soja	91,36686	1	91,36686	0,057213	0,8169701		
		Erro	12775,63	8	1596,954				
	Total	20021,93	11						
	Regressão	1347,205	1	1347,205	0,518209	0,484349	4,67	0,03	
Tempos	Resíduo	33796,5	13	2599,731					
	Total	35143,71	14						

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 15A - Análise de variância aplicada à média dos valores da eficiência de conversão de açúcar em biosurfactante (ECAÇB) por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TA} B	R ²		
ECA B	Tratament os	Glicerol	2.262008	1	333	0.108589	0.750218	5.32	0,80		
		Óleo de soja	614.4714	1	083	29.4981	0.000622				
		Glicerol por Óleo de Soja	71.49201	1	833	3.43202	0.101077				
		Erro	166.6471	8	333						
		Total	854.8725	11							
	Tempos	Regressão	353.1822	1	353.1822	104	1.964605	0.191288	4.67	0,16	
		Resíduo	1797.726	10	179.7726						
		Total	2150.908	11							

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 17A - Análise de variância aplicada à média dos valores da tensão superficial do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR -P	F _{TAB}	R ²
TENSÃO SUPERFICIAL	Tratamentos	Glicerol	554,3744	1	554,3744	1,816887	0,214606	5,32	0,45
		Óleo de soja	1323,645	1	1323,645	4,338067	0,070806		
		Glicerol por Óleo de Soja	181,492	1	181,492	0,594815	0,462732		
		Erro	2440,986	8	305,1233				
		Total	4500,498	11					
	Tempos	Regressão	691,0038	1	691,0038	3,463749	0,08549	4,67	0,21
		Resíduo	2593,447	13	199,4959				
		Total	3284,451	14					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 19A - Análise de variância aplicada à média dos valores do querosene no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	Tratament os	Glicerol	464,876	1	464,8759696	63,83583	4,41E-05	5,3 2	0,90
		Óleo de soja	73,8002	1	73,80020109	10,13409	0,012931		
		Glicerol por Óleo de Soja	16,91219	1	16,91219393	2,322348	0,166032		
		Erro	58,25894	8	7,282367779				
		Total	613,8473	11					
	Tempos	Regressão	234,3233	1	234,3233	411	0,087282	4,6 7	0,20
		Resíduo	890,763	13	68,52023				
		Total	1125,086	14					
						3,419768			

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 20A - Análise de variância aplicada à média dos valores do tolueno no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	Tratament os	Glicerol	975,923	1	975,9229743	895,797	1,68E-09	5,32	0,99
		Óleo de soja	62,83682	1	62,83682345	57,67775	6,34E-05		
		Glicerol por Óleo de Soja	7,053451	1	7,053450964	6,474343	0,03447		
		Erro	8,715573	8	1,089446569				
		Total	1054,529	11					
	Tempos	Regressã o	1089,913	1	1089,913	52,03704	6,80998E- 06	4,67	0,80
		Resíduo	272,2843	13	20,94494				
		Total	1362,197	14					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 21A - Análise de variância aplicada à média dos valores do diesel no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²	
ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	Tratamentos	Glicerol	3276,622	1	3276,6220	32	426,4631	3,17E-08	5,32	0,98
		Óleo de soja	27,5502	1	271,55015	82	35,34314	0,000344		
		Glicerol por Óleo de Soja	105,3232	1	105,32324	5	13,70817	0,006021		
		Erro	61,46599	8	7,6832484	75				
		Total	3714,961	11						
		Tempos	Regressão	820,8698	1	820,8698	789	6,631664	0,023065	
	Resíduo	1609,145	13	123,7803						
	Total	2430,014	14							

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 22A - Análise de variância aplicada à média dos valores da gasolina no índice de emulsificação do biosurfactante, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), em fermentado com glicerol e óleo de soja residual em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²	
ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	Tratamentos	Glicerol	1520,88	6	1520,8864	24	373,716	5,32E-08	5,3	0,98
		Óleo de soja	342,214	4	342,21435	63	84,0899	1,61E-05	2	
		Glicerol por Óleo de Soja	158,387	3	158,38733	03	38,9193	0,000249		
		Erro	32,557	8	4,0696247	83				
		Total	2054,04	5						
		Tempos	Regressão	11,9775	6	11,97756	1	0,57517	0,4617400	
	Resíduo	270,716	3	20,82433				75		
	Total	282,693	9							

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

APÊNDICE B

Tabela 28B – Volume da espuma em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
VOLUME DA ESPUMA	Tratamentos	Biosurfactante (L)	0,25	1	0,25	0,75	0,477767		0,97
		Clara de ovo (L)	12,25	1	12,25	36,75	0,026148		
		Biosurfactante (L) por Clara de ovo (L)	12,25	1	12,25	36,75	0,026148		
		Falta de ajuste	0,011905	1	0,011905	0,035714	0,867547		
		Error	0,666667	2	0,333333				
		Total SS	25,42857	6					
	Tempos	Regressão	135,1197	1	135,1197	60,34801	0,004438	0,95	
		Resíduo	6,717025	3	2,239008				
		Total	141,8367	4					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 30B – Estabilidade da emulsão sobre o índice de sedimentação entre os tratamentos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante, em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
ÍNDICE DE SEDIMENTAÇÃO	Tratamentos	Biosurfactante (L)	12,19012	1	12,1901	2,404	0,2611	18,51	0,95
		Biosurfactante (Q)	174,429	1	174,429	34,60	0,0277		
		Clara de ovo (L)	19,2628	1	19,2628	3,799	0,1905		
		Biosurfactante (L) por Clara de ovo (L)	17,0603	1	17,0603	3,365	0,2080		
		Error	10,1395	2	5,0697				
		Total SS	234,0818	6					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 31B –Estabilidade da emulsão sobre a capacidade de retenção de água entre os tratamentos em emulsão de clara de ovo com biosurfactante,em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA	Tratamentos	Biosurfactante (L)	258,0842	1	258,0842	134,1	0,007	18,51	0,99
		Biosurfactante (Q)	207,6486	1	207,6486	107,9	0,009		
		Clara de ovo (L)	1,5750	1	1,5750	0,818	0,4610		
		Biosurfactante (L) por Clara de ovo (L)	0,9506	1	0,9506	0,494	0,5548		
		Error	3,8468	2	1,9234				
		Total SS	472,1054	6					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 32B – Sinérese em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
	Tratamentos	Biosurfactante (L)	5,1076	1	5,1076	0,064	0,823	18,51	0,81
		Biosurfactante (Q)	222,65830	1	222,6583048	2,805	0,235		
		Clara de ovo (L)	451,5625	1	451,5625	5,689	0,1398		
		Biosurfactante (L) por Clara de ovo (L)	1,6641	1	1,6641	0,020	0,898		
		Error	158,74286	2	79,37143333				
		Total SS	839,73537	6					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 33B – Solubilidade do nitrogênio em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
SOLUBILIDADE DO NITROGÊNIO	Tratamentos	Biosurfactante (L)	5,1076	1	5,1076	0,064	0,823		0,81
		Biosurfactante (Q)	222,65830	1	222,6583048	2,805	0,235		
		Clara de ovo (L)	451,5625	1	451,5625	5,689	0,1398		
		Biosurfactante (L) por Clara de ovo (L)	1,6641	1	1,6641	0,020	0,898		
		Error	158,74286	2	79,37143333				
		Total SS	839,73537	6					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

Tabela 34B – Potencial hidrogeniônico em emulsão de clara de ovo com biosurfactante em diferentes concentrações

P	V	FV	SQ	GL	MQ	F _{CAL}	VALOR-P	F _{TAB}	R ²
SOLUBILIDADE DO NITROGÊNIO	Tratamentos	Biosurfactante (L)	1,6384	1	1,6384	--	--	18,51	1
		Biosurfactante (Q)	6,754671	1	6,754671	--	--		
		Clara de ovo (L)	2,3409	1	2,3409	--	--		
		Biosurfactante (L) por Clara de ovo (L)	1,3456	1	1,3456	--	--		
		Error	0	2	0				
		Total SS	12,07957	6					

NOTA - P=propriedade; V=variável; FV=fonte de variação; SQ=soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F= teste F (Fcal = F calculado; Ftab = F tabelado); R²= coeficiente de determinação.

ANEXO A

Tabela 35A - Fator de correção para o método do peso da gota

$r/\sqrt{1/3}$	f	$r/\sqrt{1/3}$	f	$r/\sqrt{1/3}$	f ^a
0,00	(1,0000)	0,75	0,6032	1,225	0,656
0,30	0,7256	0,80	0,6000	1,25	0,652
0,35	0,7011	0,85	0,5992	1,30	0,640
0,40	0,6828	0,90	0,5998	1,35	0,623
0,45	0,6669	0,95	0,6034	1,40	0,603
0,50	0,6515	1,00	0,6098	1,45	0,583
0,55	0,6362	1,05	0,6179	1,50	0,67
0,60	0,6250	1,10	0,6280	1,55	0,551
0,65	0,6171	1,15	0,6407	1,60	0,535
0,70	0,6093	1,20	0,6535		

Tabela 36 A – Massa de uma gota que se desprende de tubos de diferentes diâmetros

Massa da gota (g)	Raio do tubo (cm)	Massa da gota (g)	Raio do tubo (cm)
0,033450	0,09946	0,90467	0,31891
0,042347	0,13062	0,091620	0,32362
0,046901	0,14769	0,096392	0,34188
0,054678	0,17750	0,096918	0,34385
0,059700	0,19666	0,09868	0,35022
0,068026	0,23052	0,10623	0,37961
0,069869	0,23790	0,10966	0,39262
0,072682	0,23135	0,11161	0,39968
0,007753	0,26802	0,11957	0,41765
0,079680	0,27605	0,12522	0,44755
0,084270	0,29423	0,12575	0,44980
0,084880	0,29694	0,14142	0,50087